Kolorimetrische Bestimmungen mit dem Stufenphotometer bei der Untersuchung von Lebensmitteln.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT

ZU FRANKFURT AM MAIN

vorgelegt von

Hermann Keller

aus

Worms am Rhein.

1934

Druck von F. W. Kalbfleisch in Gelnhausen.

Referent: Professor Dr. J. Tillmans.

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Dezember 1933.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Nahrungsmittelchemie der Universität Frankfurt a. Main unter Leitung von Herrn Professor Dr. J. Tillmans ausgeführt.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Prof. Dr. Tillmans, meinem hochverehrten Lehrer, sowie Herrn Dr. Riffart für die wertvollen Ratschläge und die liebenswürdige Unterstützung, die diese mir bei der Ausführung meiner Arbeit zuteil werden ließen, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung: Das Stufenphotometer und seine Verwendung zu Messungen der Farbstärken gelöster Farbstoffe. 7

Experimenteller Teil:

A. Die quantitative Bestimmung des Cholesterins. . .

I. Methoden zur Bestimmung des Cholesterins. . 11

1. auf kolorimetrischem Wege 11

2. auf titrimetrischem Wege. 17

II. Anwendung der Methoden in der Lebensmittelchemie. 19

1. Untersuchung von Eiern und Eigelbpulver. . 20

2. Untersuchung von Mehl und Grieß. . . 20

3. Untersuchung von Teigwaren: . . .

a) Cholesterin in Teigwaren mit bekanntem Eigehalt. 20

b) Cholesterin in Teigwaren des Handels. . 22

c) Lecithin und Cholesterin in Handelsware. 26

d) Aetherextrakt und Cholesteringehalt. . 27

B. Die quantitative Bestimmung der Benzoesäure. . . 29

I. Kolorimetrische Methode mittels der Mohlerschen Reaktion.

1. Aufstellung der Farbkurven. 32

2. Aufstellung der Eichkurven und Eichtabelle. . 32

II. Anwendung der kolorimetrischen Methode auf verschiedene Lebensmittel. 33

C. Die quantitative Bestimmung der Salizylsäure. . .

I. Kolorimetrisch mit Eisenchloridlösung. . . 38

1. Aufstellung der Farbkurve. 39

2. Aufstellung der Eichkurve und Eichtabelle. . 40

II. Anwendung der Methode bei der Untersuchung pharmazeutischer Präparate. 41

Seite

D. Die quantitative Bestimmung des Kreatinins. . . 42

I. Die kolorimetrische Methode mittels der Jaffé-schen Reaktion. 43

1. Aufstellung der Farbkurven. 43

2. Aufstellung der Eichkurven und der Eichtabelle. 44

II. Anwendung der Methode bei der Untersuchung von Fleischextraktpräparaten. 45

1. Beeinflussung der Kreatininreaktion durch die Zusatzstoffe der Fleischbrühwürfel. . . 45

2. Einwirkung der Permanganatbehandlung auf Kreatinin. 46

3. Zerstörung der Zusatzstoffe durch Permanganat. 47

4. Untersuchung von Präparaten des Handels. . 49

E. Die quantitative Bestimmung der höheren Alkohole, der Aldehyde und des Furfurols. . . . 50

I. Bestimmung der höheren Alkohole. . . . 52

1. Die kolorimetrische Methode mit p-Oxybenz-aldehyd. 53

a) Farbstärken der einzelnen höheren Alkohole. 54

b) Aufstellung der Farbkurve einer Typlösung. 56

c) Aufstellung der Eichkurven u. der Eichtabelle. 56

2. Anwendung der Methode bei der Untersuchung von Weinbrand und Weinbrandverschnitt.

a) Vorbehandlung des Weinbrandes. . 58

b) Höhere Alkohole im 30%igen Destillat. . . 59

II. Bestimmung der Aldehyde. . . . . .

1. Kolorimetrische Methode mit dem Schiffschen Reagenz. 60

a) Aufstellung der Farbkurven einer Acetal-dehydtyplösung. 60

b) Aufstellung der Eichkurven und der Eich-tabelle. 61

2. Anwendung der Methode bei Weinbränden. . 62

III. Bestimmung des Furfurols.

1. Die kolorimetrische Methode mit Anilin und Eisessig. 62

a) Aufstellung der Farbkurve. . . . 63

b) Aufstellung der Eichkurve und Eichtabelle. 64

Einleitung:

Das Stufenphotometer und seine Verwendung zu Messungen der Farbstärken gelöster Farbstoffe.

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln werden in ausgedehntem Maße kolorimetrische Methoden angewandt, die sich gegenüber denen der Gewichts- und Maßanalyse durch leichtere Erfassung noch kleinerer Mengen auszeichnen und somit eine Ersparnis an Zeit und Material bedeuten. In der Kolorimetrie wird die Konzentration einer gefärbten Substanzlösung aus ihrer Farbintensität durch Vergleich mit einer Flüssigkeit bekannten Gehaltes ermittelt, indem man durch Aenderung der Schichtdicke einer Lösung auf Farbengleichheit einstellt. Doch hat diese Methodik verschiedene Nachteile, die darin bestehen, daß die beiden Lösungen nicht immer im Farbton genau übereinstimmen, und daß die Standardlösung von bekannter Konzentration in vielen Fällen nicht haltbar und deshalb jedesmal neu herzustellen ist. Weiterhin sind die gebräuchlichsten Verfahren auch von der Farbentüchtigkeit des Beobachters und der individuellen Verschiedenheit des Begriffes „Farbengleichheit" abhängig. Alle diese Schwierigkeiten der einfachen Kolorimetrie fielen mit der Einführung des spektrophotometrischen Prinzips weg. Dabei bewährte sich das Stufenphotometer von Prof. Pulfrich, mit dem erprobte Vorschriften weitgehend verbessert und die Ausarbeitung neuer kolorimetrischer Methoden ermöglicht wurde. Es sei hier von einer ausführlichen Beschreibung der außerordentlich praktischen Apparatur unter Hinweis auf spezielle Monographien von Urbach[1]) und Heilmeyer[2]) abgesehen und nur das erwähnt, was zum Verständnis der folgenden Versuche notwendig ist.

Das Stufenphotometer in der Ausrüstung als Farbmesser ist seiner Wirkung nach ein auf die Bedürfnisse der Praxis eingestelltes, vereinfachtes Spektralphotometer von großer Lichtstärke. Es dient bei der Untersuchung von farbigen Flüssigkeiten als ein verfeinertes Kolorimeter mit wagrechtem Strahlengang.

---

[1]) C. Urbach: Stufenphotometrische Absorptionsbestimmungen in der medizinischen Chemie, E. Haim, Wien.

[2]) Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 2, Teil II 2, S. 2337.

Die Farbstärke der zu untersuchenden Lösung wird darin zahlenmäßig erfaßt, indem an die Stelle eines subjektiven Eindrucks eine objektiv meßbare Größe gesetzt wird, die verhältnismäßig einfach und dennoch exakt zu bestimmen ist. Im folgenden soll nun zunächst die Apparatur, dann der Vorgang der Messung und schließlich die Berechnung der Ergebnisse geschildert werden.

Das Stufenphotometer besteht aus einem auf Unendlich eingestellten monokularen Doppelfernrohr, in dessen Ocular man zwei durch eine scharfe Linie getrennte Halbkreise sieht, deren Helligkeiten einzeln durch zwei quadratische Blenden reguliert werden können. Durch Drehen an bezifferten Meßtrommeln, die mit diesen Blenden in Verbindung stehen, wird die quadratische Oeffnung für das Strahlenbüschel verändert, wobei die Zahlen auf der Trommelteilung unmittelbar Helligkeitsprozente bedeuten. Eine Eigenart dieser Zifferneinteilung ist dabei, daß der Strichabstand für je 1% immer größer wird, je kleiner die Oeffnung der Blende gemacht wird. Da nun auch das Auge bei geringer werdenden Helligkeiten immer kleinere Helligkeitsstufen unterscheiden kann, so paßt sich also diese Teilung der Trommel der natürlichen Empfindung des Auges an. Von dieser Beziehung leitet sich die Bezeichnung Stufenphotometer ab.

In diesem Apparat befindet sich unmittelbar hinter dem Ocular eine drehbare Scheibe, die acht Farbfilter enthält, deren Nummern ein ungefähres Maß für die mittlere Wellenlänge jener Strahlungen angeben, die von dem weißen Licht einer Nitralampe durch das Filter hindurchgehen.

Bei der Ausführung der Messung wird zunächst der Apparat bezüglich seiner richtigen Aufstellung überprüft. Dann füllt man die zu untersuchende, gefärbte Lösung in eine Glasküvette von geeigneter Schichtdicke und bringt diese in den Strahlengang vor die eine Photometeröffnung. Vor die andere Photometeröffnung bringt man darauf eine Küvette gleicher Schichtdicke, die mit dem Lösungsmittel gefüllt ist. Dadurch werden bei den Messungen die Lichtverluste an den Küvettenfenstern und im Lösungsmittel kompensiert, was besonders wichtig ist bei der Bestimmung der Absorption eines Farbstoffes, der in einem bereits gefärbten Lösungsmittel vorhanden ist.

Der Apparat ist nun für kolorimetrische Messungen ohne Vergleichslösung fertig und die Messung selbst ist eine rein photometrische, bei der nur auf gleiche Helligkeit der beiden Feldhälften eingestellt wird, und die besonders da großen Wert erlangt, wo die sonst angewandte Vergleichslösung nicht haltbar oder schwer herzustellen ist. Die Farbmessung selbst wird nach

Vorschaltung eines Filters und Einstellung des Oculars auf größte Schärfe der Trennungslinie zwischen den beiden Feldern dadurch vorgenommen, daß man die eine Meßtrommel unter ständiger Beobachtung durch das Ocular auf Seiten der mit Wasser gefüllten Küvette langsam soweit hereindreht, bis Helligkeitsgleichheit der beiden Gesichtshälften erreicht ist. Die Ablesungen an der Trommelskala entsprechen dann direkt der Intensität des von der Lösung hindurchgelassenen Lichtes in Prozenten des einfallenden Lichtes. Erhält man aber dabei Werte über 70 und unter 5%, so wird die Untersuchung der betreffenden Lösung in einer anderen Schichtdicke oder bei einer anderen Konzentration vorgenommen. Das endgültige Resultat ergibt sich erst nach mehrfacher Wiederholung dieser Messung aus dem arithmetischen Mittelwert und fällt mit dem wahren Wert im allgemeinen sehr nahe zusammen.

Um die Unterschiede der Lichtabsorption, die die Färbung einer in Durchsicht betrachteten Flüssigkeit bedingen, für die verschiedenen Spektralgebiete festzustellen, wird die so beschriebene Messung nacheinander mit allen Spektralfiltern vorgenommen. Aus den Ablesewerten erhält man dann durch graphische Darstellung die Absorptionskurve (Farbkurve) der gefärbten Flüssigkeit. Da die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung eines Farbstoffes mit der Stärke der Absorption der zu untersuchenden Lösung wächst, benutzt man für weitere Messungen nur dasjenige Filter, das Strahlungen solcher Wellenlängen hindurchläßt, die von der Untersuchungslösung stark absorbiert werden. Es ist daher jenes Filter das geeigneteste, mit dem sich für die Durchlässigkeit der kleinste Wert ergibt. Die Ablesung an der Trommel ist dabei ein Maß für die Schwächung, die das Licht von der Farbe des Filters in der Probe erfahren hat. Sie bedeutet die Intensität des von der Probe durchgelassenen Lichtes und ist durchaus von der Schichtdicke und der Farbstoffkonzentration abhängig. Die letztere Beziehung wird durch das Gesetz von Lambert-Beer ausgedrückt, das besagt, daß der Extinktionskoeffizient, welcher der negative Logarithmus der durchgelassenen Lichtintensität ist, der Farbenintensität direkt proportional ist. Es muß daher in einer Reihe von Lösungen bekannter Konzentration nachgeprüft werden, ob der jeweilige Extinktionskoeffizient proportional mit der Konzentration zunimmt. Ist dies der Fall, so berechnet man den unbekannten Gehalt einer Lösung aus ihrem Extinktionskoeffizienten und dem einer Lösung von bekannter Konzentration. In zahlreichen Fällen läßt sich die Methode noch weitgehend durch die Anwendung von

Eichkurven und Eichtabellen vereinfachen. Bei der Anlegung der ersteren geht man so vor, daß an einer Reihe von entsprechend abgestuften Lösungen mit bekannter Konzentration Messungen vorgenommen werden. Man füllt also die nach dem einmal festgelegten Verfahren hergestellte Untersuchungslösung in ein Absorptionsgefäß von jeweils gleicher Schichtdicke und stellt nach Vorschalten des geeigneten Filters mit der Trommelschraube auf gleiche Helligkeit ein. Einerseits wird dann jede Ablesung in Abhängigkeit von der Konzentration auf Diagrammpapier eingetragen und die einzelnen Punkte zu einer Kurve verbunden, aus der dann direkt die Konzentration entnommen werden kann. Andererseits bestimmt man zuerst zu jeder Ablesung den Extinktionskoeffizienten und trägt diesen mit der zugehörigen Konzentration ebenfalls in ein Koordinatensystem ein. Ergibt dabei die Verbindungslinie dieser Punkte eine gerade Linie, so verlaufen die Farbreaktionen in der untersuchten Lösung nach den Forderungen des Lambert-Beerschen Gesetzes.

Weiterhin können auch die mit dem Stufenphotometer erhaltenen Ablesungen oder deren Extinktionskoeffizienten tabellarisch zusammengestellt werden, indem man in der zweiten Spalte einer Tabelle für jeden Wert der Meßtrommel den dazugehörigen Gehalt der Lösung anführt.

Abschließend sei bemerkt, daß, wie sich bei den späteren Versuchen mit dem Stufenphotometer gezeigt hat, durch dieses abgekürzte spektrophotometrische Verfahren noch leicht Konzentrationsunterschiede festgestellt werden können, die im direkten Anblick oder beim Vergleich in einfachen Kolorimetern kaum noch einen Unterschied erkennen lassen.

In der vorliegenden Arbeit sind mit der beschriebenen Apparatur quantitative colorimetrische Bestimmungen einer Reihe von Substanzen ausgeführt worden, die für die Lebensmittelchemie eine wichtige Rolle spielen. Es wurden bestimmt:

1. Cholesterin,
2. Benzoesäure,
3. Salizylsäure,
4. Kreatinin,
5. Höhere Alkohole,
6. Aldehyde,
7. Furfurol.

Experimenteller Teil.

A. Methoden zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins in Eiern, Mehl und Teigwaren.

Die Anwesenheit von Eisubstanz in Lebensmitteln wird durch die Bestimmung der Lecithinphosphorsäure und des Cholesterins nachgewiesen, von denen wiederum das Cholesterin durch seine größere Beständigkeit eine bessere Grundlage für eine genaue Beurteilung bietet. Es sind bisher die verschiedensten Verfahren ausgearbeitet worden, die auf kolorimertrischen, titrimetrischen und gravimetrischen Wege das Cholesterin quantitativ erfassen, worüber in einer Arbeit von Tillmans-Riffart-Kühn[1]) eine Uebersicht der vorhandenen Literatur zu finden ist. Die vorliegenden Versuche verfolgten den Zweck, neue Methoden der Cholesterinbestimmung zu finden, um sie für die Untersuchung von Teigwaren anzuwenden.

1. Die kolorimetrische Bestimmung des Cholesterins mit Hilfe des Stufenphotometers.

Die kolorimetrische Methode stützt sich auf die von Liebermann und Burchard[2]) zuerst mitgeteilte Farbreaktion des Cholesterins. Authenrieth und Funk[5]) haben später die günstigsten Bedingungen für das Zustandekommen der Farbe und ihre Ausnützung zur quantitativen Bestimmung angegeben. Der Nachweis beruht darauf, daß man die Lösung des Cholesterins in Chloroform mit Essigsäureanhydrid und wenig konzentrierter Schwefelsäure versetzt, wobei eine grüne Farbe entsteht, deren Stärke in der Authenriethschen Apparatur mit Hilfe eines geeichten Farbkeiles bestimmt wird. Spätere Untersuchungen von Brill und Hopf,[6]) sowie Bohn und Bickenbach[7]) ergaben jedoch, daß die Feststellung der Farbwerte mit dem Helligekeil keines-

---

[3]) Z. U. L. 1930, Bd. 60, S. 561.
[4]) Hammerstein, Lehrb. f. physiol. Chemie, Verl. J. F. Bergmann, München 1922, S. 195.
[5]) Münch. Mediz. Wochenschrift, 1913, Bd. 60, S. 1243.
[6]) Münch. Mediz. Wochenschrift, 1930, Bd. 77, S. 142.
[7]) Zeitschr. f. ges. exper. Medizin, 1930, Bd. 71, S. 566.

wegs Anspruch auf Genauigkeit erheben kann. Sie haben daher ihre Untersuchungen mit dem Stufenphotomter ausgeführt und bei Harnfarbanalysen und Blutserumbestimmungen gute Erfolge erzielt.

Es war die Aufgabe, dieses neue Meßverfahren auch für die Untersuchung von Eiern und Teigwaren auszugestalten. Hierbei wurden zunächst die Nachteile der bisher angewandten Methode beseitigt, die darin bestehen, daß die konzentrierte Schwefelsäure in Chloroform unlöslich ist und durch deren Zugabe vor allem unkontrollierbare Erhitzungen entstehen. Diese Fehler wurden ausgeglichen durch die Verwendung von Essigäther, worin die konzentrierte Schwefelsäure löslich ist und ferner durch vorheriges Temperieren des mit konzentrierter Schwefelsäure versetzten Essigäthers und erst nachträglichem Zugeben der Nudelauszüge, wodurch konstante Temperaturen eingehalten werden konnten.

Da weiterhin nach dem neuen Meßverfahren nur beim eigentlichen Versuch und nicht beim blinden Versuch Essigsäureanhydrid zugesetzt wird, so war zu beweisen, daß durch diesen Essigsäureanhydridzusatz an und für sich durch seine Einwirkung auf die in den Nudelauszügen vorhandenen Mehl- und Eibestandteile keine die kolorimetrische Bestimmung beeinflussende Färbungen entstehen. Eine etwaige Wirkung der konzentrierten Schwefelsäure auf diese Stoffe wird durch den blinden Versuch, der in jedem einzelnen Falle ausgeführt wird, ausgeschaltet. Der Beweis nun, daß Essigsäureanhydrid die exakte Cholesterinbestimmung nicht beeinflußt, wurde durch folgenden Versuch erbracht. Von der Annahme ausgehend, daß bei erhöhter Essigsäureanhydridkonzentration auch eine Verstärkung etwaiger Einwirkungen auf die in den Nudelauszügen vorhandenen Bestandteile festzustellen sein muß, wenn solche Einwirkungen überhaupt bestehen, wurde die Farbreaktion sowohl mit reinen Cholesterinlösungen als auch mit einem Eiernudelauszug ausgeführt und zwar derart, daß die Versuchsanordnung mit schwachen und stärkeren, in beiden Fällen aber gleichen Essigsäureanhydridkonzentrationen durchgeführt wurde. Durch stufenphotometrische Messungen wurden dann die Aenderungen der Farbintensität in beiden Fällen bestimmt. Dabei wurde beobachtet, daß auch bei wechselndem Essigsäureanhydridgehalt die Farbreaktionen der Eiernudelauszüge in gleichem Maße ablaufen, wie die der reinen Cholesterinlösungen.

Die Farbstärke der Liebermannschen Reaktion ist von verschiedenen äußeren Bedingungen, wie der Menge der konzen-

trierten Schwefelsäure, der Temperatur, Belichtung und Zeit abhängig. Diese Faktoren wurden bei der Ausarbeitung der nachstehenden Methode beachtet und nur genaues Innehalten der einmal aufgestellten Arbeitsvorschrift ergibt bei gleicher Cholesterinkonzentration den gleichen Farbton und die gleiche Farbstärke.

Ausführung der Bestimmung.

Die zu bestimmende Cholesterinmenge wird durch gelindes Erwärmen in 10 ccm Essigäther gelöst und nach dem Filtrieren durch Nachwaschen mit letzterem auf 20 ccm gebracht. Dann mischt man in einem mit Glasstopfen versehenen Reagenzglas 9 ccm Essigäther mit 4 ccm Essigsäureanhydrid, gibt 0,8 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu und kühlt nach dem Umschütteln 10 Minuten durch Einstellen in Wasser von 20°. Gleichzeitig werden in einem zweiten Glase 13 ccm Essigäther mit 0,8 ccm konzentrierter Schwefelsäure gemischt und ebenfalls gekühlt. In beide Gläser gibt man darauf je 1 ccm der Cholesterinlösung, schüttelt gut durch und kühlt wieder 5 Minuten bei 20°. Die beiden Lösungen werden nun in die Glasküvetten eingefüllt und in den Strahlengang des Stufenphotometers eingeschaltet.

Um die Auswahl des geeigneten Farbfilters zu treffen, wurde die Lichtintensität einer 10 mg%igen Cholesterinlösung, die nach obiger Vorschrift behandelt wurde, bei nacheinander folgender Anwendung der acht Farbfilter gemessen und die Werte in einem Koordinatensystem in Kurvenform eingetragen. Aus dem Verlauf dieser Kurve ging hervor, daß das Filter S 61 die größte Lichtabschwächung zeigt und deshalb am geeignetesten ist, da es bei den kleinsten Aenderungen der Cholesterinkonzentration die größte Trommelverschiebung von allen Filtern nötig macht.

An einer Reihe bekannter Cholesterinkonzentrationen wurde dann die Zeitdauer bis zur Erreichung des Höhepunktes der Lichtintensität mit dem Filter S 61 festgestellt, wobei entgegen den Angaben von Authenrieth beobachtet wurde, daß der Höchstwert der Farbstärke nicht konstant nach 15 Minuten, sondern wechselnd in verschiedenen Zeitspannen (von 15—60 Minuten) eintritt. Daher ist also der jeweilige Höhepunkt durch wiederholte Messung in kurzen Zeitabständen zu bestimmen, wie dies in Tabelle I ausgeführt ist.

Weiter ergaben die Untersuchungen bei der Prüfung der Anwendungsmöglichkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes, daß die Farbtiefe bei steigender Cholesterinkonzentration entsprechend zunimmt, ohne Aenderung des Charakters der Farbe. Die Ein-

tragung der verschiedenen Werte für die Lichtintensitäten bei zunehmender Cholesterinkonzentration in ein Koordinatensystem ergab die von dem Absorptionsgesetz geforderte logarithmische Kurve (Kurve 1), während die Extinktionskoeffizienten in gleicher Weise aufgetragen eine gerade Linie bilden. (Kurve Nr. 2). Der zahlenmäßige Ausdruck für die Beziehungen zwischen Konzentration und Lichtabschwächung ist in der Tabelle II zu finden.

Kurve Nr. 1

Eichkurve der direkten Ablesewerte für den Cholesteringehalt in 100 ccm Essigäther.

Filter S. 61
Kammer 20 mm

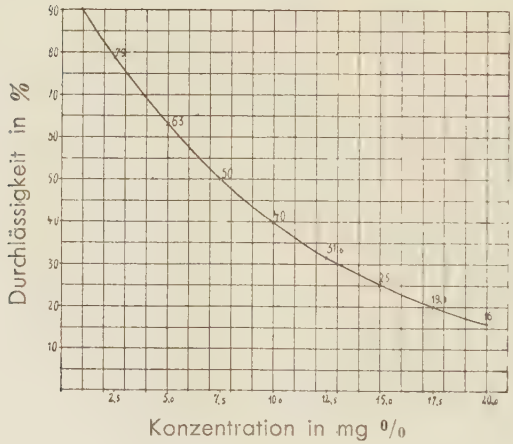


Tabelle I.

Zeitliche Veränderungen der Farbintensitäten einer durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure gemäß der angeführten Arbeitsvorschrift erhaltenen Cholesterinlösung. Gemessen gegen Wasser unter Vorschaltung des Filters S 61 in verschiedenen Schichtdicken bei einer Temperatur von 20°.

Zeit nach Zugabe d. Chol.-Lösung Min.	Schichtdicke der Kammer mm	Cholesterinkonzentration in 10 ccm Essigäther 5 mg % Die Ablesungen der Durchlässigkeit in % 1.	2.	3.	2,5 mg % Die Ablesungen der Durchlässigkeit in % 1.	2.	3.
10	30	85	84	83	96	95	95
	20	86	89	88	97	98	97
20	30	71	70	69	85	83	84
	20	78	77	78	94	92	93
30	30	60	58	59	78	79	78
	20	71	70	68	87	85	85
40	30	52	54	53	74	75	73
	20	66	67	66	85	84	84
50	30	50	51	50	73	72	73
	20	62	64	63	83	82	83
60	30	49,5	50	50	70	71	72
	20	65	66	66	81	80	79
70	30	51	51	52	72	73	74
	20	67	67	67	82	82	83
80	30	53	53	52	74	73	74
	20	68	69	68	83	83	84
90	30	53	54	54	74	75	75
	20	69	70	70	85	84	86
100	30	55	54	55	74	75	76
	20	70	70	71	85	87	86
110	30	55	56	56	76	75	76
	20	71	71	72	87	88	88
120	30	58	59	59	77	78	78
	20	73	74	76	89	90	91

Kurve Nr. 2.

Eichkurve der Extinktionskoeffizienten für den Cholesteringehalt in 100 ccm einer Essigätherlösung.

Filter S 61
Kammer 20 mm

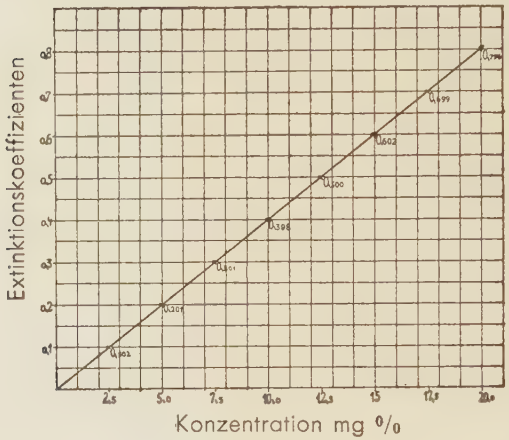


Tabelle II.

Cholesterin-Konzentration in Essigäther mg %	Schicht-dicke der Kammer mm	Durchlässig-keit des Filters S 61 in %	Extinktions-koeffizient auf Schichtdicke 10 mm bezogen
2,5	20	79	0,051
2,5	30	72	0,048
5,0	20	64,5	0,095
5,0	30	50	0,100
7,5	10	70	0,155
7,5	20	51	0,146
7,5	30	35,5	0,150
10,0	10	64	0,194
10,0	20	39,5	0,201

Entgegen den Angaben von Bohn und Bickenbach trifft also das Beersche Gesetz hier zu und es läßt sich eine unbekannte Cholesterinkonzentration aus dem erhaltenen Ablesewert der Trommel mit Hilfe der Kurven oder durch Rechnung bestimmen.

Für eine Nachprüfung der gefundenen Ergebnisse wurde die titrimetrische Methode nach Tillmans-Riffart-Kühn als Vergleich herangezogen, wobei sich jedoch eine Abänderung der Originalvorschrift als zweckmäßig erwies.

2. Die titrimetrische Bestimmung des Cholesterins.

Tillmans-Riffart-Kühn haben in ihrer Arbeit eine Methode vorgeschlagen, die im Prinzip darauf beruht, daß das Cholesterin mit Digitonin gefällt und durch eine bestimmte Menge eines Chromat-Schwefelsäuregemisches oxydiert wird. Auf jodometrischem Wege wird dann der Verbrauch an Chromsäure ermittelt und der Cholesteringehalt mit Hilfe eines empirisch gefundenen Faktors berechnet. Eine Bedingung für die Brauchbarkeit dieser Vorschrift ist natürlich, das Cholesterin-Digitonid frei von jeder Verunreinigung v o r der Oxydation zu erhalten und es dann v o l l k o m m e n zu oxydieren. Da diese Erfordernisse in der Arbeit dieser Autoren nicht restlos erfüllt schienen, wurde auf Grund der Versuche von Yusada[8]) die Vorschrift abgeändert und durch neue Untersuchungen ihre Anwendbarkeit bewiesen. Der Unterschied des von Yusada angewandten Verfahrens gegenüber der Digitoninmethode beruht darauf, daß der Digitonidniederschlag von dem Filter mit heißem, absolutem Alkohol gelöst wird, während Kühn ihn auf dem Filter selbst durch Bichromat-Schwefelsäure oxydiert. Das Lösen des Niederschlages in absolutem Alkohol hat den Vorteil, daß in Alkohol unlösliche Verunreinigungen, wie Filterfasern, nicht mitoxydiert werden, was zweifellos eine Verbesserung bedeutet.

Die Arbeitsgänge der kombinierten Methode sollen hier ausführlich beschrieben werden, denn nur ihre genaueste Einhaltung ergibt vergleichbare Resultate.

An Lösungen und Chemikalien werden benötigt:

1. 0,5%ige Lösung von Digitonin Merck in 80%igem Alkohol;
2. Chrom-Schwefelsäure, die durch Auflösen von 10 g Kaliumbichromat in 1 lt. konzentrierter Schwefelsäure hergestellt und vom unlöslichen Rest durch Dekantieren getrennt wird;
3. n/10 Natriumthiosulfatlösung, 10%ige Jodkalilösung und 1%ige Stärkelösung;
4. Aether, Aceton, Chloroform, absoluter Alkohol und doppeltdestilliertes Wasser, sämtlich vollkommen rein und filtriert.

---

[8]) Journ. of biol. Chemistry 92, S. 103.

Die Filtration des Digitonidniederschlages wird in einem Glasfilter von Seitz vorgenommen, dessen Boden noch mit einer dünnen Asbestschicht bedeckt wird. Außen ist es luftdicht von einem Dampfmantel umgeben, durch den aus einem Kolben Wasserdampf geleitet werden kann. Die zur Oxydation benötigten Jodzahlkolben, sowie das Filter werden vorher sorgfältig mit Chromschwefelsäure gereinigt.

Ausführung der Bestimmung.

Bei der Ausführung wird das Cholesterin in Aceton durch Erwärmen gelöst und 2 ccm davon, die nicht mehr als 2 mg Cholesterin enthalten sollen, werden in einem 100 ccm Becherglas mit 4 ccm der Digitoninlösung versetzt und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, wobei das Cholesterin als Digitonid gefällt wird. Nach dem Durchblasen von Luft wird der Rückstand mit 10 ccm Wasser aufgenommen, vorsichtig zum Sieden erhitzt und einige Minuten bei dieser Temperatur gehalten, um das überschüssige Digitonin in dem heißen Wasser vollkommen zu lösen. Hierbei bilden aber die evtl. vorhandenen Lipoide (z. B. bei der Untersuchung von Teigwaren) mit dem Digitoninüberschuß eine kolloidale Flüssigkeit, die nur mit Schwierigkeit filtriert werden könnte. Dieser kolloidale Zustand wird daher durch Zufügen von 20 ccm Aceton aufgehoben, in dem die Lipoide sich sofort lösen, wonach die Filtration ausgezeichnet gelingt. Der Niederschlag wird nun quantitativ auf das Glasfilter gebracht und nacheinander mit je 1,5 ccm folgender Flüssigkeiten ausgewaschen: 2mal mit Aether, 2mal mit Chloroform und wieder 3mal mit Aether, wobei durch langsames Absaugen auch die an den Wänden haftenden Niederschlagsteilchen auf das Filter hinabgespült werden.

Nach diesen Waschungen wird das Filter von der Filtrationsflasche auf die Oxydationsflasche gesetzt und durch den Dampfmantel Wasserdampf geleitet. Nach einigen Minuten gibt man alsdann im ganzen 20 ccm absoluten Alkohol in kleinen Portionen in das erwärmte Filterröhrchen, wodurch der Niederschlag gelöst wird und in die Flasche gelangt. Ein zu starkes Sieden wird dabei durch schnelleres Saugen vermieden. Durch Einstellen in ein siedendes Wasserbad verjagt man darauf den Alkohol, wobei man zweckmäßig die letzten Anteile durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Den Rückstand versetzt man mit 10—20 ccm der Chromschwefelsäure und beendet die Oxydation durch einstündiges Erhitzen im siedenden Wasserbade. Nach dem Abkühlen wird für je 10 ccm der angewandten

Chromschwefelsäure 100 ccm doppeltdestilliertes Wasser und nach dem nochmaligen Erkalten 5 ccm 10%ige Jodkalilösung zugefügt. Das ausgeschiedene Jod wird mit n/10 Thiosulfatlösung titriert, wobei man erst gegen Ende der Titration 2 ccm der 1%igen Stärkelösung als Indikator zusetzt. Im blinden Versuch stellt man dann den Jodverbrauch von 10 ccm der angewandten Chromschwefelsäure fest. Die Differenz der beiden Werte ergibt die dem Chromsäureverbrauch entsprechende Anzahl ccm n/10 Thiosulfatlösung.

Nach dieser Methode wurde zunächst an reinen Lösungen der von Kühn gefundene Faktor nachgeprüft und als Mittel der gleiche Wert von 8,7 ccm n/10 Thiosulfatlösung erhalten. (Tabelle III.)

Angewandte Menge Cholesterin mg	Verbrauchte Chromsäure in ccm n/10 Thiosulfatlösung	Verbr. Chromsäure in ccm n/10 Thiosulfatlösung f. 1 mg Cholesterin
0,5	4,45	8,90
0,5	4,25	8,50
1,0	8,75	8,75
1,0	8,85	8,85
1,0	8,50	8,50
1,5	13,25	8,83
1,5	13,00	8,67
2,0	17,10	8,55
2,0	17,30	8,65
2,5	21,85	8,74
3,0	25,65	8,55
3,0	26,25	8,75
	Mittel	8,68

II. Die quantitative kolorimetrische und titrimetrische Bestimmung des Cholesterins in Eiern, Mehl und Teigwaren.

Nach den günstigen Ergebnissen bei Anwendung der beiden obigen Methoden an reinen Lösungen, wurden die Untersuchungen auf eihaltige Produkte ausgedehnt, wozu als Grundlage zuerst in Mischungen verschiedener Eier der Cholesteringehalt festgestellt wurde. Da eine Verseifung des Aetherextraktes nach

Kühn unnötig ist, wurde die direkte Bestimmung des Cholesterins in folgender Weise vorgenommen:

1. Cholesterin in Eiern.

Eine äquivalente Menge des Eigelbes von mehreren Eiern wurde mit Seesand auf dem Wasserbade getrocknet, dann im Soxleht mit Aether 6 Stunden extrahiert und der erhaltene Aetherrückstand bei 100° getrocknet und gewogen. Darauf wurde je eine bestimmte Menge durch gelindes Erwärmen teils in Aceton, teils in Essigäther gelöst. Nach dem Filtrieren ist dann auf ein Volumen von 20 ccm aufgefüllt und auf titrimetrischem und kolorimetrischem Wege das Cholesterin bestimmt worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt und entsprechen den von anderen Autoren gefundenen, wobei Doppelbestimmungen innerhalb der Fehlergrenzen gut übereinstimmen.

Nach diesen Versuchen wurde der Cholesteringehalt in Teigwaren selbst geprüft, wobei für die Extraktion die Arbeitsweise von Kühn herangezogen wurde.

Je 30 g der gemahlenen und gut gemischten Teigware werden 6 Stunden mit Aether im Soxleht extrahiert, die Aetherrückstände durch Erwärmen einerseits in Essigäther, andererseits in Aceton gelöst, filtriert und auf 20 ccm gebracht. Der jeweilige Cholesteringehalt wird darauf nach den beiden obigen Verfahren ermittelt.

2. Sterin in Mehl.

In einigen Mehlen und Grießen des Handels wurde der Gehalt an Phytosterinen festgestellt durch Ermittlung der Cholesterinmenge, da die Farbkurven des Cholesterins und Phytosterins fast übereinstimmen. Aus Tabelle IV sind die Resultate ersichtlich, die einen auffallend hohen Steringehalt der Grieße und Sojamehle zeigen. Der letztere Befund ist von Bedeutung, da besonders in der letzten Zeit von Seiten der Teigwarenindustrie Vorschläge zur Verwendung von Sojamehlen bei der Herstellung von Nudeln gemacht werden. Ein Gehalt von Sojamehl würde danach das Vorhandensein von Ei bezw. einen höheren Eigehalt vortäuschen.

3. Cholesterin in Teigwaren.

Nach diesen Versuchen wurden im Haushalt sieben Nudelsorten durch Verwendung aliquoter Teile der vorher untersuchten Eier- und Mehlsorten hergestellt, die einen verschiedenen Eigehalt für je 500 g Mehl hatten. In zwei weiteren Proben ist

Tabelle IV.

Nr.	Bezeichnung	Gewicht des Eidotters g	Gewicht des Eiweißes g	Aetherextrakt des Eigelbs %	Cholesteringehalt in 1 Eigelb Stupho mg	in 1 Eigelb Digit. mg	bezogen auf 16 g Eigelb Stupho mg	bezogen auf 16 g Eigelb Digit. mg
1.	Eigelbpulver (8 g = 16 g Eigelb)	8,0	—	27,1	242	234		
					238	246	240	240
2.	Frisches Eidotter (Mittel von 8 Eiern)	16,21	31,4	28.7	251	241	248	238
					247	257	244	254
3.	Frisches Eidotter (Mittel von 3 Eiern)	18,34	33,4	27,8	270	262	236	229
					264	268	230	234
						Mittel	239,7	239

Tabelle V.

Nr.	Bezeichnung	Wasser	Sterin in 100 g Trockenmehl gefunden als Cholesterin	
			Stupho	Digitonin
		%	mg	mg
1.	Weizenmehl 00	11,0	18,4	17,6
2.	Hartgrieß I	9,8	24,5	24,3
3.	Roggenmehl (70%ig)	10,5	11,1	10,2
4.	Weizenmehl 0 Spez.	12,0	12,0	11,1
5.	Sojabohnenmehl (ungeschält)	10,2	63,5	60,5
6.	Sojamehl 00	9,9	54,3	53,2
7.	Hartgrieß II	10,3	25,3	24,1
8.	Weizenmehl 0	9,5	14,5	--

ein Eigelbpulver benutzt worden, von dem 8 g einem normalen Eidotter entsprachen. Ein Vergleich der aus den einzelnen Bestandteilen berechneten Gehalte an Cholesterin mit den nach den beiden Verfahren gefundenen Werten ergibt, wie Tabelle VI zeigt, gute Uebereinstimmung, wobei jedoch die nach der Digitonidmethode erhaltenen Zahlen etwas niedriger liegen.

Anschließend an die Nudelsorten mit bekanntem Eigehalt wurde eine große Reihe weiterer Teigwaren untersucht, die teils durch Kauf aus dem Handel bezogen, teils dem hiesigen Amte anläßlich der Lebensmittelkontrolle gesandt wurden. Mit diesen Proben sind folgende Prüfungen vorgenommen worden:

1. Feststellung von künstlichem Farbstoff,
2. Cholesteringehalt
   a) nach der abgeänderten Digitonidmethode,
   b) nach der kolorimetrischen Methode mit dem Stufenphotometer,
3. Lecithinphosphorsäure nach der Strychnin-Molybdanmethode.

Die erhaltenen Werte sind dann auf 100 g Trockensubstanz ohne Abzug des im Mehl vorhandenen Cholesterin- und Lecithingehaltes bezogen worden. Der Eizusatz auf 500 g Mehl wurde einmal nach der Juckenackschen Tabelle und weiterhin nach der Cholesterintabelle (Nr. VII) festgestellt. Für die Berechnung des Eizusatzes aus dem Cholesteringehalt wurde gemäß einer vorsichtigen Beurteilung der von Kühn gefundene niedrigste

Tabelle VI.

Eier-nudeln	Mehl-sorte der Tab. V	Ei-zusatz auf 500 g Mehl	Eizusatz in Form von		Wasser	Cholesterin in 100 g Trockennudeln				
						berechnet aus dem für Mehl u. Eiern ermittelten Gehalt	gefunden			
							mittels Stupho		mittels Digitonin	
			Eigelb-pulver	Ei-gelb			Menge	Eier in 500 g Mehl	Menge	Eier in 500 g Mehl
		Stück	g	Stück	%	mg	mg	Stück	mg	Stück
1	1	1,5	12	—	13,8	97,6	98,0	1,5	95,9	1,5
2	2	1,5	12	—	13,7	104,2	103,5	1,5	99,6	1,4
3	2	1,5	—	1,5	13,4	106,1	102,3	1,4	100,6	1,4
4	4	1,5	—	1,5	12,4	94,7	93,5	1,5	91,2	1,4
5	1	1,5	—	1,5	12,5	99,3	100,6	1,5	96,8	1,5
6	1	1,5	—	1,5*	12,2	100,4	101,7	1,5	98,2	1,5
7	7	0,5	—	0,5	13,2	51,4	50,1	0,5	48,9	0,45
8	8	0,5	—	0,5	12,3	40,3	38,5	0,5	38,1	0,5
9	8	0,75	—	0,75	12,9	53,2	50,2	0,70	—	—

*) mit Eiweißzusatz.

Wert für ein Eigelb mit 203 mg eingesetzt, während für den Steringehalt des Mehles 12,3 mg %, für den des Grießes 25 mg % angenommen wurde.

Tabelle VII.

Zusatz auf 500 g Mehl	Cholesterin in gewöhnlicher Teigware mg %	Cholesterin in Hartgrießware mg %
½ Ei	32,6	45,3
1 „	52,9	65,6
1,5 „	73,2	85,9
2 Eier	93,5	106,2
2,5 „	113,8	126,5
3 „	134,1	146,8

In den weiteren Tabellen VIII, IX und X sind die Ergebnisse der Untersuchungen von Teigwaren des Handels angeführt, die jeweils gute Uebereinstimmung der nach den verschiedenen Verfahren gewonnenen Werte erkennen lassen.

Tabelle VIII.

Bestimmung des Cholesteringehaltes mit dem Stufenphotometer.

Nr.	Bezeichnung	künstl. Farbstoff	Cholesterin in 100 g Trockensubstanz mg	Ei in 500 g Mehl nach der Chol. Tab. Stück
1.	Eierschnittnudeln	+	13.5	0
2.	Suppennudeln	+	20.6	0
3.	Sternchennudeln	0	26,8	0.25
4.	Grießmakkaroni[9])	+	21.8	0
5.	Eiersuppeneinlagen	0	85,7	1,8
6.	Eiernudeln	0	104,9	2,3
7.	Sternchennudeln	+	14.5	0
8.	Fadennudeln	+	11,6	0
9.	Suppenmakkaroni[9])	+	23.8	0
10.	Sterncheneiernudeln	0	97,2	2,1
11.	Eiernudeln	0	86,4	1,8
12.	Eiernudeln (lose)	+	20,1	0
13.	Eierfadennudeln	+	12,0	0
14.	Eiernudeln	0	99,8	2,2
15.	Eiermakkaroni[9])	0	68,8	1,4
16.	Eiersuppeneinlage	0	63,3	1,25

[9]) Hartgrießware.

Tabelle IX.

Vergleichende Cholesterinbestimmung mittels des Stufenphotometers und des Digitonidverfahrens nach Tillmans-Riffart-Kühn.

Nr.	Bezeichnung	künstl. Farbstoff	Cholesterin in 100 g Trockensubstanz nach dem Digitonidverfahren mg	Ei auf 500 g Mehl nach d. Chol. Tab. Stück	Cholesterin in 100 g Trockensubstanz mit dem Stupho mg	Ei auf 500 g Mehl nach d. Chol.Tab. Stück
1.	Eierfadennudeln	0	106,6	2,3	104,2	2,25
2.	Eiersuppeneinlage	0	91,6	1,9	94,5	2,0
3.	Eiersuppen-hörnchen[10])	+	28,0	0	30,8	0
4.	Sojanudeln	0	62,3	0	66,2	0
5.	Sojafadennudeln	0	51,2	0	50,1	0
6.	Eiernudeln	0	83,2	1,5	85,7	1,5
7.	Eiernudeln	0	55,3	1,0	52,2	1,0
8.	Eiermakkaroni[10])	0	91,1	1,6	97,3	1,8
9.	Eierfadennudeln	0	74,1	1,5	71,9	1,5
10.	Eiermakkaroni[10])	0	108,3	2,0	102,1	1,9

[10]) Hartgrießware.

Tabelle X.

Vergleichende Bestimmung des Cholesterins mit dem Stufenphotometer und der Lecithinphosphorsäure nach Tillmans-Riffart-Kühn.

Nr.	Bezeichnung	künstl. Farbstoff	Lecithinphosphorsäure in 100 g Trockensubstanz mg	Eigehalt in 500 g Mehl nach Juckenack Stück	Cholesterin in 100 g Trockensubstanz mg	Eigehalt nach d. Chol. Tab. Stück
1.	Eierschnittnudeln	0	72,9	1,8	95,3	2,1
2.	Eiernudeln	0	53,5	1,0	52,0	1,0
3.	Eiernudeln	0	67,0	1,5	72,0	1,5
4.	Eiersuppeneinlage	0	57,0	1,2	63,9	1,3
5.	Eiersuppeneinlage	0	68,0	1,5	80,5	1,6
6.	Eiernudeln	0	75,4	1,9	100,2	2,2
7.	Eiersuppenhörnchen	0	25,0	0	20,3	0
8.	Eierschnittnudeln	0	37,2	0,5	41,7	0,7
9.	Eiernudeln	0	58,0	1,2	59,7	51,2
10.	Eierringe	0	74,8	1,9	94,2	2,0
11.	Eierschnittnudeln	0	57,8	1,2	59,0	1,2
12.	Eiersuppenteig	0	55,8	1,1	55,0	1,1
13.	Eierriebeln	0	42,3	0,7	51,0	0,9
14.	Eiermakkaroni[11])	0	35,0	0,4	41,2	0,4

Im allgemeinen entsprachen bei diesen Untersuchungen die Teigwaren in Originalpackungen den zu stellenden Mindestanforderungen von ca. $1^1/_4$ Ei auf 1 Pfd. Mehl und nur in einigen Fällen betrug der Eigehalt nur ca. 1 Ei. Wiederholt wurde die Beobachtung gemacht, daß als Eierteigwaren deklarierte Produkte, die künstlich gelb gefärbt waren, keinen oder nur einen ungenügenden Eizusatz erhalten hatten.

Aus Tabelle X ist ersichtlich, daß sich aus den Werten für Lecithinphosphorsäure teilweise ein etwas niedrigerer Eigehalt ergibt, als der aus dem Cholesteringehalt errechnete. Die Unterschiede sind aber sehr gering; sie betragen im Höchstfalle bei den Nudeln Nr. 1 und 6 ca. 0,3 Ei. Vielleicht hat bei diesen Proben ein Rückgang der Lecithinphosphorsäure stattgefunden, wie er von früheren Forschern, u. a. auch Tillmans-Riffart-Kühn, bei langer und besonders bei feuchter Lagerung beobach-

[11]) Hartgrießware.

tet wurde. Da, wie schon eingangs erwähnt, diese Autoren einen Rückgang des Cholesterins auch bei langer Lagerung nicht beobachtet hatten, so ist der quantitativen Cholesterinbestimmung besonders zur Beurteilung von Teigwaren eine erhöhte Bedeutung beizumessen. Die hier angegebenen Verfahren ermöglichen einen exakten quantitativen Nachweis des Cholesterins und haben ferner den Vorteil, daß in demselben Arbeitsgang auch die Prüfung auf künstlichen Farbstoff erfolgen kann.

Aetherextrakt und Cholesteringehalt.

In späteren Untersuchungen wurde das Gewicht des nach der Extraktion erhaltenen Aetherrückstandes bestimmt und auf 500 g Trockensubstanz bezogen. (Tabelle XI.) Dabei zeigt ein Vergleich mit dem ermittelten Cholesteringehalt der gleichen Proben, daß der Bestimmung des Aetherextraktes allein bei der Beurteilung nur geringe Bedeutung beizumessen ist. Nur bei hohen Aetherextrakten dürfte auf das Vorhandensein einer genügend großen Menge Eisubstanz geschlossen werden können.

Tabelle XI.

Nr.	Bezeichnung	künstl. Farbstoff	Aetherextrakt in 500 g Trockensubst. g	Cholesterin in 100 g Trockensubst. mg.	Ei auf 500 g Mehl nach d. Chol. Tab. Stück
1.	Eiersuppennudeln	0	12,0	63,8	1,3
2.	Eiernudeln (lose)	0	10,9	66,8	1,3
3.	Eiernudeln (lose)	0	12,3	64,5	1,3
4.	Eiernudeln	0	11,5	87,1	1,8
5.	Eierschleifchen	0	9,7	84,8	1,8
6.	Eiernudeln	+	3,5	18,1	0
7.	Eiersuppeneinlage	0	8,6	63,6	1,3
8.	Eiermakkaroni[12])	0	12,1	93,3	1,7
9.	Bandnudeln	0	8,5	62,5	1,3
10.	Bandnudeln	0	12,6	103,1	2,3
11.	Eierschleifchen	0	10,1	80,5	1,6
12.	Eiernudeln	0	12,2	85,0	1,75
13.	Eiermakkaroni[12])	0	6,9	43,2	0,5
14.	Eiersuppenteig	0	9,4	69,3	1,1
15.	Eierfadennudeln	0	9,8	73,1	1,5
16.	Eiergraupen[12])	+	5,4	28,5	0
17.	Eierfadennudeln[12])	0	10,3	72,6	1,2
18.	Eiersuppenteig[12])	0	7,8	54,4	0,8

[12]) Hartgrießware.

Zusammenfassung.

1. Das Cholesterindigitonidverfahren von Tillmans-Riffart-Kühn wurde auf Anregung von Yusuda abgeändert. In einer größeren Anzahl von Untersuchungen ist die Brauchbarkeit der verbesserten Methode festgestellt worden.
2. Ein kolorimetrisches Cholesterinbestimmungsverfahren mittels des Stufenphotometers wurde ausgearbeitet, das gestattet, auch kleine Cholesterinmengen exakt und in verhältnismäßig kurzer Zeit zu bestimmen.
3. Die dabei mit der Liebermannschen Reaktion erhaltenen Färbungen sind unter Einhaltung einer bestimmten Arbeitsvorschrift in ihrer Farbstärke proportional der angewandten Cholesterinkonzentration. Dieser Befund steht somit in Widerspruch zu den Mitteilungen von Bohn und Bickenbach.
4. Das Cholesterin-Digitonidverfahren und die kolorimetrische Methode wurden auf die Untersuchung von Mehlen, Eiern Eierteigwaren angewandt. Vergleichende Untersuchung durch die Bestimmung der Lecithinphosphorsäure nach Tillmans-Riffart-Kühn ergaben auch hier übereinstimmende Werte.
5. Der Bestimmung des Aetherextraktes kommt nur geringe Bedeutung zu.

B. Kolorimetrische Bestimmung der Benzoesäure mit dem Stufenphotometer.

Für die Haltbarmachung von Nahrungsmitteln wird in größerem Maße Benzoesäure und benzoesaures Natrium verwendet. Ein bestimmter Höchstgehalt ist aber in dem „Entwurf einer Verordnung über Konservierungsmittel", der von dem Reichsgesundheitsamt herausgegeben wurde, in einem Verzeichnis der einzelnen Lebensmittel vorgeschrieben. Um bei einer Untersuchung diese Vorschriften nachprüfen zu können, sind Methoden notwendig, die eine exakte Bestimmung der Benzoesäure gewährleisten. Von den verschiedenen Verfahren, die für diesen Zweck in Betracht kommen, eignet sich die Mohlersche Reaktion am besten dafür, zu einem genauen Verfahren der Farbmessung im Stufenphotometer ausgearbeitet zu werden, da sie auch von anderen Autoren[13]) zur quantitativen Bestimmung vorgeschlagen wurde.

E. Mohler[14]) hat folgende Vorschrift zum Nachweis der Benzoesäure gegeben:

Der Abdampfrückstand des ätherischen Auszuges wird zur Zerstörung der Fremdstoffe mit Schwefelsäure bis auf 240° erhitzt und dann durch Zugabe von Kaliumnitrat nitriert. Nach der Neutralisation wird die entstandene Dinitrobenzoesäure mit Schwefelammonium zu Amidonitro- oder Diamidobenzoesäure reduziert, deren Ammoniumverbindungen rotbraun gefärbt sind.

Dieses Verfahren ist von späteren Autoren[15]) verschiedentlich umgewandelt worden, wobei vor allem die hohe Erhitzung dadurch wegfiel, daß die Nitrierung im siedenden Wasserbade vorgenommen wurde. Eine weitere Aenderung der ursprünglichen Vorschrift wurde von Großfeld[16]) vorgeschlagen, der das Schwefelammonium durch ein anderes Reduktionsmittel, das Hydroxylaminchlorhydrat ersetzt. Durch die Verwendung des neuen Salzes sind die Nachteile des Schwefelammoniums beseitigt worden, die darin bestehen, daß letzteres einmal durch seine

---

[13]) Großfeld, Z. U. L. 1915, 30, S. 271.
[14]) Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 202.
[15]) v. d. Heyde und Jakob, Z. U. L. 1910, 19, 137.
[16]) Z. U. L. 1915, 30, 271.

Eigenfarbe geringe Färbungen verdeckt oder in ihrer Nuance verändert, und daß es besonders mit Verunreinigungen, wie sie den Reagenzien und der schließlich erhaltenen Benzoesäure anhaften können, störende Färbungen gibt. Auch andere Konservierungsmittel sind gegen Hydroxylamin sehr beständig. Es sei bemerkt, daß weder Mikrobin (p-Chlorbenzoesäure) noch die Ester der p-Oxybenzoesäure, Nipagin und Nipasol mit dem vorstehenden Reagenz Rotfärbungen geben. Es treten dabei nur gelbe, gelbgrüne oder gelbbraune Färbungen auf, wie auch Tabelle XII zeigt. Nur mit Benzol, das als Extraktionsmittel der Benzoesäure dienen kann, und Zimtsäure entstehen gleich starke Reaktionen, deren Farbton sich aber deutlich von dem einer reinen Benzoesäurelösung durch eine mehr weinrote Färbung unterscheidet.

Tabelle XII.
Konservierungsmittel.

Substanz	Ergebnis der mit der Mohlerschen Reaktion behandelten Lösung.	Farbe der erhaltenen Lösung.
Benzoesäure	positiv	rot
Salizylsäure	negativ	gelb
Phenolphtalein	negativ	gelb
Mikrobin (p-Chlorbenzoesäure)	negativ	gelbgrün
Nipagin (p-Oxybenzoesäuremethylester)	negativ	gelb
Nipasol M (Methylnipagin)	negativ	gelbbraun
Zimtsäure	positiv	braunrot
Benzol	positiv	weinrot

Für die weiteren Versuche wurde zur Bestimmung der Benzoesäure der Arbeitsgang von Großfeld[17]) gewählt, der sich nach folgender Vorschrift richtet:

Die in Aether gelöste Benzoesäure wird in einem Reagenzglase vorsichtig im Wasserbade bei 50° zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 1 ccm einer Lösung von 25 g Kaliumnitrat in 250 ccm konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und 20 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, wodurch die Nitrierung

[17]) Z. U. L. 30, 271.

herbeigeführt wird. Darauf wird auf 20° abgekühlt und mit 2 ccm destilliertem Wasser versetzt. Nach abermaligem Kühlen werden 10 ccm 15%iger Ammoniak in kleinen Portionen unter weiterer ständiger Kühlung zugegeben und darauf in der Kälte noch 2 ccm einer 2%igen wässerigen Lösung von salzsaurem Hydroxylamin zugefügt. Die Reaktionsmischung wird dann durch Einstellung in Wasser auf einer Temperatur von 20° gehalten. Nach einigen Minuten geht dabei die Gelbfärbung in charakteristischer Weise in ein schönes Rot über, dessen Intensität im Verlaufe einer halben Stunde stetig zunimmt (s. Zeittabelle XIII).

Tabelle XIII.

Zeitliche Veränderung der Farbintensitäten einer mittels der Mohlerschen Reaktion erhaltenen Benzoesäurelösung. Gemessen gegen die angegebene Kompensationsflüssigkeit unter Vorschaltung des Filters S 50. in der Kammer 10 mm bei einer Temperatur von 20°.

Zeit nach Zugabe d. Hydroxylaminlsg. in Minuten	Schichtdicke d. Kammer mm	1 mg Benzoesäure in 15 ccm der Reaktionsflüssigkeit Ablesungen der Durchlässigkeit in %			
		1.	2.	3.	4.
5	10	70	68	69	68
10	10	60	62	58	60
15	10	50	52	52	51
20	10	43	44	43	42
25	10	39	40	40	41
30	10	40	39	39	40
40	10	39	41	41	40
50	10	41	40	40	39
60	10	41	42	42	41
80	10	43	42	42	41
100	10	44	45	45	44

Das oben angegebene Verfahren weist jedoch gegenüber der Originalvorschrift einige Abänderungen auf, die im Verlaufe der ausgeführten Versuche als notwendig erachtet wurden. So ist der ätherische Benzoesäureauszug nicht im siedenden Wasserbade, sondern bei 50° verdampft worden wegen der leichten Sublimierbarkeit der Benzoesäure. Weiter wurde der Ammoniak vor der Hydroxylaminlösung zugegeben, und die dabei entstehende Neutralisationswärme erst durch Abkühlung ausgeglichen,

da eine bei erhöhter Temperatur stattfindende Reaktion keine analogen Werte für steigende Konzentrationen ergab. Auch das spätere Einstellen in Wasser von 60° wurde unterlassen, da auch hier die Farbe nicht gleichmäßig mit der erhöhten Konzentration anstieg, was wohl auf einer Zerstörung des gebildeten Farbstoffes beruht.

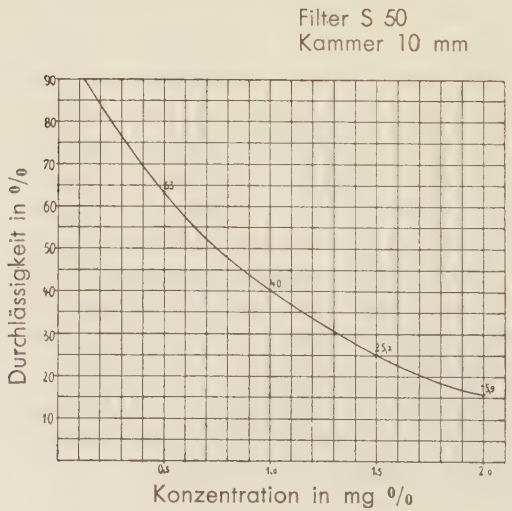
Aufstellung der Kurven.

Um die Farbkurve aufzustellen, wurde 1 ccm einer 100 mg%igen ätherischen Lösung der Benzoesäure nach obiger Vorschrift behandelt und bei abwechselnder Vorschaltung sämtlicher Filter photometriert. Dabei wurde die Ausschaltung der Eigenfarbe der Lösung dadurch vorgenommen, daß zur Kompensation eine Lösung verwendet wurde, in der die gleiche Benzoesäuremenge durchbehandelt wird, der jedoch statt der 2 ccm Hydroxylaminlösung 2 ccm Wasser zugegeben waren. Nach der Farbkurve ist das Filter S 50 am geeignetsten und es wurde daher bei allen nachfolgenden Versuchen vorgeschaltet.

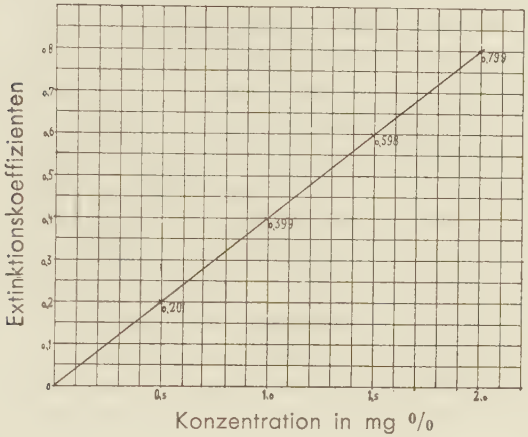
Bevor weitere Messungen durchgeführt wurden, mußte erst festgestellt werden, wann die Farbintensität ihren Höhepunkt erreicht. Aus der Tabelle XIII kann ersehen werden, daß

Kurve Nr. 3

Eichkurve der direkten Ablesewerte für den Benzoesäuregehalt in 1 ccm des alkalischen Auszuges.



Kurve Nr. 4
Eichkurve der Extinktionskoeffizienten
für den Benzoesäuregehalt in einem 1 ccm des alkalischen Auszuges.
Filter S 50
Kammer 10 mm



dieser nach 35 bis 40 Minuten eintritt, und es muß daher die Messung innerhalb dieser Zeit durchgeführt werden.

In Lösungen mit einem Gehalt von 0,5 bis 2 mg Benzoesäure wurden dann die Farbstärken der einzelnen Konzentrationen durch wiederholte Ablesungen in Abständen von einigen Minuten bis zum Höhepunkt der Lichtintensität bestimmt, deren Meßergebnisse die Kurve 3 bilden. Weiterhin ist aus der kurvenmäßigen Darstellung der Extinktionskoeffizienten (Kurve 4) die Gültigkeit des Beerschen Gesetzes zu ersehen, mit dessen Hilfe in den späteren Versuchen der Gehalt an Benzoesäure aus der Tabelle XIV ermittelt wurde.

II. Kolorimetrische Bestimmung der Benzoesäure in Lebensmitteln.

Für die Bestimmung der Benzoesäure in Lebensmitteln sind nach Prüfung die Arbeitsmethoden von Großfeld[18]) zur Isolierung herangezogen worden, die sich bei der Anwendung auf die späteren Untersuchungen auch bewährt haben. Die Analyse zerfällt dabei in drei Teile :

[18]) Z. U. L. 1927, 53, 467.

1. Ueberführung der Benzoesäure in eine wässerige Lösung, die mit organischen Lösungsmitteln leicht auszuschütteln ist.
2. Extraktion der Benzoesäure unter Verwendung von geeigneten Lösungsmitteln.
3. Die kolorimetrische Messung der isolierten Benzoesäure.

Tabelle XIV.

Konzentration der Benzoesäure	Schichtdicke d. Kammer	Durchlässigkeit in % bei Filter S 50	Extinktionskoeffizient auf Schichtdicke 10 mm bezogen	Mittelwert
mg	mm		k	k
0,5	20	39	0,204	
0,5	30	27	0,190	
0,5	10	62,5	0,205	0,201
0,5	30	25	0,201	
0,5	20	38,5	0,207	
1,0	10	39	0,409	
1,0	20	15,5	0,405	
1,0	30	6,5	0,396	0,399
1,0	20	16,5	0,392	
1,0	10	40,5	0,393	
1,5	10	25,0	0,602	
1,5	20	6,5	0,594	0,598
1,5	10	25,5	0,593	
1,5	5	50	0,602	
2,0	10	16	0,796	
2,0	10	15,5	0,810	
2,0	5	40	0,796	0,799
2,0	5	39	0,816	
2,0	2,5	64	0,776	

Zu 1)

Um die Benzoesäure in eine ausschüttelbare Lösung überzuführen, müssen die in den Lebensmitteln enthaltenen Kolloide, die die Ausschüttelung durch evtl. Emulsionsbildung stören, beseitigt werden. Nach Großfeld ist hierfür das Verfahren von Carrez[19]) am vorteilhaftesten, da die Benzoate dabei durch die angewandten Fällungsmittel nicht angegriffen werden und die

[19]) Ann. chim. Analyt. 1909, 14, 187.

Klärung selbst in schwach alkalischen Flüssigkeiten vorgenommen werden kann.

Zu 2)

Zur Ausschüttelung der Benzoesäure wird Aether verwendet, der die Benzoesäure zu 99,5% löst, wobei der geringe Verlust von ½% praktisch nicht ins Gewicht fällt.

Zu 3)

Die quantitative Bestimmung der erhaltenen Benzoesäure wurde nach der oben beschriebenen kolorimetrischen Methode, die auch Jones[20]) bei seinem Vergleich der verschiedenen kolorimetrischen Benzoesäurebestimmungen empfohlen hat, im Stufenphotometer vorgenommen.

Die folgenden Versuche, in denen man nach den Vorschriften von Großfeld[21]) vorging, lieferten, wie Tabelle XV zeigt, gute Resultate. Dafür wurden zunächst die erforderlichen Lösungen hergestellt, indem man 150 g Kaliumferrocyanid und 30 g Zinksulfat mit Wasser zu je 1 lt auflöste.

Isolierung der Benzoesäure.

Die Ueberführung der Benzoesäure in die wässerige Lösung erreicht man bei den verschiedenen Lebensmitteln in folgender Weise:

a) von Butter oder Margarine werden 50 g in einen Rundkolben abgewogen und nach Zusatz von Phenolphthalein im Wasserbad geschmolzen. Dann fügt man soviel n/4 Natronlauge und gemessene Mengen Wasser hinzu, bis auch nach längerem Umschütteln die Rotfärbung bestehen bleibt, und ergänzt dann mit Wasser auf im ganzen 100 ccm Flüssigkeit. Nach kräftigem Schütteln läßt man erkalten und gießt nach Durchstoßen des Fettkuchens die untere Schicht ab, von der man 50 ccm in einen 100 ccm Meßkolben überführt.

b) Von Hackfleisch verrührt man 20 g mit 1 g Calciumcarbonat und etwa 150 ccm Wasser und führt die Mischung in einen 200 ccm Meßkolben über. Nach Zusatz von einigen Tropfen Phenolphthaleinlösung alkalisiert man mit n/4 Natronlauge, erhitzt 15 Minuten im siedenden Wasserbade, läßt erkalten und filtriert 50 ccm ab.

---

[20]) Chem. Zentralbl. 1925, 2, 1783.
[21]) Z. U. L. 53, 467.

c) Von Milch werden 50 ccm im 100 ccm Meßkolben mit Natronlauge alkalisch gemacht unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator.

d) Bei Himbeersaft werden 50 ccm nach Zusatz von Natronlauge sofort in einen Scheidetrichter gebracht.

Zur Klärung werden die so erhaltenen Benzoatlösungen in den Meßkolben bei Milch und Butter mit je 5 ccm, bei Hackfleisch mit je 1 ccm der Kaliumferrocyanit- und Zinksulfatlösung versetzt. Nach kräftigem Umschütteln bei der jedesmaligen Zugabe wird bis zur Marke aufgefüllt und filtriert.

Von den Filtraten bringt man dann je 50 ccm in einen Scheidetrichter, säuert mit 1 ccm verdünnter Schwefelsäure an und schüttelt zweimal einige Minuten kräftig mit je 50 ccm Aether aus. Nach Trennung der Schichten und Ablassen der unteren Phase wird der Aether zwei- bis dreimal mit 0,5 ccm

Tabelle XV.

Nr.	Art des Lebensmittels	mg Benzoesäure in 100 g: vorhandene Menge	zugesetzt	im ganzen	mg Benzoesäure wiedergefunden	Differenz mg
1.	Hackfleisch	0	50,0	50,0	49,0	— 1,0
					47,0	— 3,0
2.	Butter	0	100,0	100,0	98,8	— 1,2
					97,4	— 2,6
3.	Milch	0	100,0	100,0	99,5	— 0,5
					99,8	— 0,2
4.	Himbeersaft	0	100,0	100,0	100,5	+ 0,5
					98,8	— 1,2
5.	Margarine I	65,0	50,0	115,0	114,5	— 0,5
					116,0	+ 1,0
6.	Margarine I	65,0	100,0	165,0	164,2	— 0,8
					163,9	— 1,1
7.	Margarine II	0	10,0	10,0	8,4	— 1,6
					6,4	— 3,6
8.	Margarine II	0	20,0	20,0	19,8	— 0,2
9.	Margarine II	0	30,0	30,0	29,6	— 0,4
10.	Margarine II	0	200,0	200,0	202,2	+ 2,2
					198,2	— 1,8

Wasser ausgewaschen und dann mit so viel n/10 Natronlauge ausgeschüttelt, bis die durch das Phenolphtalein bewirkte Rosafärbung dauernd bestehen bleibt. Den alkalischen Auszug gibt man darauf in ein graduiertes Reagenzglas, wäscht den Aether mit kleinen Mengen Wasser mehrmals nach und ergänzt die vereinigten Flüssigkeiten mit letzterem auf 10 ccm. Zweimal je 1 ccm davon verdampft man dann in einem Reagenzglas zur Trockne und führt die kolorimetrische Messung nach dem oben beschriebenen Verfahren aus.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, wurden bei den untersuchten Lebensmitteln die zugesetzten Mengen an Benzoesäure mit geringen Verlusten, die evtl. durch die Flüchtigkeit der Benzoesäure zu erklären sind, wiedergefunden. Auffallend jedoch ist die verhältnismäßig große Differenz im Versuch 7, bei dem der Margarine nur eine Menge von 10 mg % zugesetzt war. Diese Beobachtung stimmt aber mit den Erfahrungen von Großfeld überein, der auch bei kleinen Konzentrationen merkliche Benzoesäureverluste feststellte.

Zusammenfassung.

1. Die Mohlersche Reaktion in der von Großfeld abgeänderten Form wurde mit dem Stufenphotometer zur quantitativen Bestimmung der Benzoesäure ausgearbeitet.
2. Aufstellung einer Farbkurve und der Eichkurven für verschiedene Konzentrationen.
3. In verschiedenen Lebensmitteln wurde die Benzoesäure quantitativ festgestellt.
4. Die Entfernung der Kolloide gelang dabei am einfachsten mittels Ferrocyankalium und Zinksulfat nach evtl. Koagulierung der Hauptmenge der Proteinstoffe durch Erhitzen.
5. Die Ausschüttelung der Benzoesäure wurde mit Aether vorgenommen und nur bei Mengen unter 5 mg in 100 ccm Flüssigkeit merkliche Verluste festgestellt.
6. Für den Nachweis und die Bestimmung der Benzoesäure in Milch, Butter, Margarine, Hackfleisch und Himbeersaft sind mit den Arbeitsvorschriften von Großfeld gute Resultate erzielt worden.

C. Die kolorimetrische Bestimmung der Salizylsäure mit dem Stufenphotometer.

Die Salizylsäure wurde früher besonders zur Konservierung von Fruchtsäften angewandt. Sie ist in neuerer Zeit durch andere Konservierungsmittel verdrängt worden und wird heute nur noch wegen ihrer großen Haltbarmachung und ihrer bequemen Verwendbarkeit in Kleinbetrieben benutzt. Ihre Gesundheitsschädlichkeit gab Veranlassung, daß in dem vom Reichsgesundheitsamt herausgegebenen „Entwurf einer Verordnung über Konservierungsmittel" die Verwendung der Salizylsäure für sämtliche Lebensmittel verboten wurde.

Zum Nachweis der Salizylsäure ist die brauchbarste Reaktion die Violettfärbung, die beim Hinzufügen einiger Tropfen einer Eisenchloridlösung zu der wässrigen oder alkoholischen Lösung der Salizylsäure auftritt. Die Empfindlichkeit der Reaktion ist so groß, daß selbst in sehr hohen Verdünnungen noch der Nachweis geführt werden kann. Die Verfahren, die auf dieser Reaktion beruhen, benützen zum Vergleich im Hehnerzylinder die Färbung einer bekannten reinen Salizylsäurelösung. Aber diese Bestimmung stellt immerhin große Ansprüche an die Farbentüchtigkeit des Beobachters, da es hierbei ziemlich schwierig ist, geringe Farbunterschiede festzustellen. Es wurde deshalb für die folgenden Versuche das Stufenphotometer herangezogen, mit dem der Farbton und die jeweilige Farbstärke an einer Reihe von Lösungen bekannter Konzentrationen festgestellt wurde.

Ausführung der Bestimmung.

10 ccm einer neutralen Lösung, die nicht mehr als 10 mg % Salizylsäure enthalten darf, werden mit 0,4 ccm einer 0,5%igen Eisenchloridlösung versetzt und nach kräftigem Umschütteln in die geeignete Küvette gebracht. Zur Kompensation wird eine zweite Küvette mit Teilen einer Mischung von 10 ccm destilliertem Wasser und 0,4 ccm des Reagenzes gefüllt. Die Eisenlösung, deren Haltbarkeit zeitlich stark begrenzt ist, ist für jede weitere Bestimmung, die in einem späteren Zeitraum stattfindet, frisch herzustellen.

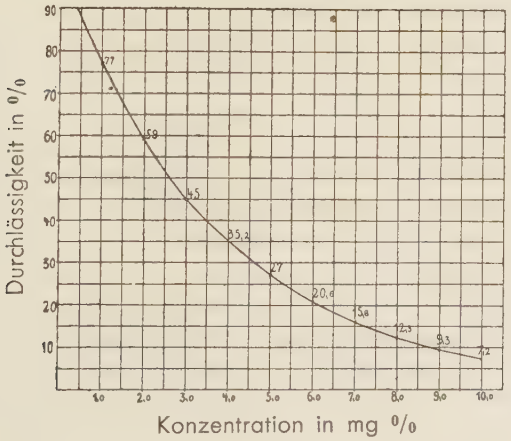
Zunächst wurden dann die Durchlässigkeitswerte einer Lösung, die 10 mg % Salizylsäure enthielt, nach der Messung mit den 8 Filtern auf Millimeterpapier eingetragen. Nach der Kurve liegt der tiefste Punkt bei dem Filter S 53, das deshalb bei den späteren Ablesungen stets vorgeschaltet wurde.

Die Messung der Farbstärken, die bei dieser Reaktion sofort ihren Höhepunkt erreichen, wurde darauf in Lösungen mit einem Gehalt von 1 bis 10 mg % vorgenommen. Die zugehörigen Ablesewerte ergaben nach ihrer Verbindung die Kurve 5. Weiterhin zeigt die durch Darstellung der Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Konzentration erhaltene Eichkurve einen geradlinigen Verlauf und ist damit der Beweis gegeben, daß die Reaktionen der Salizylsäure nach dem Beerschen Gesetz verlaufen. Die Berechnung des Salizylsäuregehaltes einer unbekannten Lösung wird danach aus den Ablesewerten mit Hilfe der Kurven oder aus der Tabelle XVI nach dem gültigen obigen Gesetz ausgeführt. Zu diesen Versuchen ist eine Salizylsäure verwendet worden, die den Anforderungen des Deutschen Arzneibuches VI genügte.

Kurve Nr. 5.

Eichkurve der direkten Ablesewerte für den Salicylsäuregehalt in 100 ccm eines neutralen Auszuges.

Filter S 53
Kammer 10 mm



Kurve Nr. 6

Eichkurve der Extinktionskoeffizienten
für den Salicylsäuregehalt in 100 ccm eines neutralen Auszuges.
Filter S 53
Kammer 10 mm

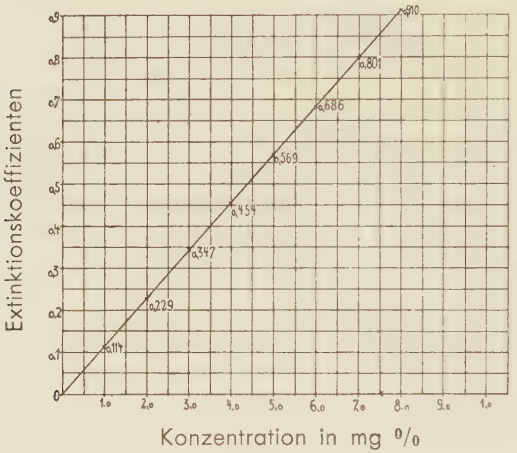


Tabelle XVI.

Konzentration der Salizyl-säure mg %	Schicht-dicke der Kammer mm	Durchlässig-keit bei Filter S 53 in %	Extinktions-koeffizient k
1,0	10	77	0,114
2,0	10	59	0,229
3,0	10	45	0,347
4,0	10	35,2	0,454
5,0	10	27	0,569
6,0	10	20,6	0,686
7,0	10	15,8	0,801
8,0	10	12,3	0,910
9,0	10	9,3	1,032
10,0	10	7,2	1,143

Die Anwendbarkeit der Methode für die Bestimmung der Salizylsäure in Lebensmitteln wurde hier nicht nachgeprüft, da Schwierigkeiten weder bei der Isolierung noch bei der stufenphotometrischen Messung zu erwarten sind. Lediglich in pharma-

zeutischen Präparaten (Magnesium acetylo-salicylicum) wurde die Salizylsäure bestimmt und zwar sowohl in dem ätherlöslichen Teil, als auch nach dem Verseifen in der wässerigen Lösung des unlöslichen Rückstandes. Wie aus der Tabelle XVII ersichtlich ist, stimmen dabei die berechneten Werte mit den gefundenen gut überein.

Tabelle XVII.

Bezeichnung	Salizylsäuregehalt. berechnet	im ätherlösl. Teil gefunden	im wasserlösl. Teil gefunden
	mg	mg	mg
Pulver I	157	—	160
Pulver II	157	100	152
Pulver III	150	152	148
Pulver IV	145	50	142
Pulver V	165	—	170

Zusammenfassung:

1. Es wurde mit dem Stufenphotometer die Salizylsäure mittels Eisenchlorid bestimmt.
2. In pharmazeutischen Präparaten ist die Methode angewandt worden.

D. Die kolorimetrische Bestimmung des Kreatinins mit dem Stufenphotometer.

Die charakteristischen Bestandteile des Fleischextraktes, der zur Herstellung von Fleischbrühwürfeln verwendet wird, sind das Kreatin und sein Anhydrid, das Kreatinin. Für die Feststellung des Gehaltes an Fleischextrakt treten daher Methoden in den Vordergrund, die auf der Bestimmung dieser Körper aufgebaut sind. Unter diesen hebt sich vom praktischen Standpunkte aus die kolorimetrische Methode hervor, die auf der grundlegenden Arbeit von Folin[22]) beruht. Dieser benutzte die von Jaffé[23]) entdeckte Reaktion des Kreatinins mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung, und spätere Veröffentlichungen anderer Forscher beziehen sich auf die Prüfung und die Anwendung dieser Bestimmung bei der Analyse von Fleischextraktpräparaten. Eine eingehende Zusammenstellung und Besprechung der diesbezüglichen Literatur findet man bei Geret[24]) sowie Baur und Trümpler[24a]), welche die von anderen Autoren ausgearbeiteten Vorschriften wiedergeben.

Da die Jaffésche Reaktion die Grundlage der kolorimetrischen Methode ist, sollen hier kurz ihre chemischen Vorgänge erwähnt werden:

Versetzt man eine Kreatininlösung mit alkalischer Pikrinsäurelösung, so entsteht alsbald eine granatrote Färbung, die nach einiger Zeit ihren höchsten Grad erreicht. Die Aehnlichkeit des Farbtones veranlaßte Chapman[25]) zu der Annahme, daß die Pikrinsäure hierbei zu Pikraminsäure reduziert werde. Diese Folgerung ließ sich aber durch das sonstige Verhalten der Farblösung nicht erklären, wozu noch die Unmöglichkeit des Nachweises der Pikraminsäurebildung kam. Eine gewisse Klärung dieser Frage gelang Greenwald und Groß[26]) bei der genaueren Untersuchung des von Bank und Benedikt[27]) aus der Jafféschen

[22]) Zeitschr. physiol. Chem. 1904, 41, 233.
[23]) Zeitschr. physiol. Chem. 1886, 10, 299
[24]) Z. U. L. 1921, 24, 570.
[24a]) Z. U. L. 1914, 27, 697.
[25]) Chemical News 1909, 100, 175.
[26]) Journ. of Biol. Chem. 1924, 59, 601.
[27]) Journ. of Americ. Chem. Soc. 1925, 47, 1443.

Reaktionslösung isolierten roten Körpers. Sie kamen zu der Auffassung, daß eine Verbindung von je 1 Molekül Pikrinsäure und Kreatinin vorliege und daß außerdem die Pikrinsäure anscheinend noch anderweitig gebunden sei. Bei der Fortsetzung seiner Arbeit gelangte Greenwald dann zu dem Schluß, daß als Träger der Farbreaktion ein Tautomeres des schon von Jaffé hergestellten gelben Kreatininprikats anzusehen ist. Der Zusammenhang zwischen dem gelben und roten Kreatininprikrat liegt also in einer Keto-Enoltautomerie, wobei die in der alkalischen Folinschen Lösung vorhandene Enolform als Grund für die Rotfärbung angesehen wird. Diese lagert sich beim Ansäuern in die Ketoform um, wodurch die Farbe von Rot in Gelb übergeht.

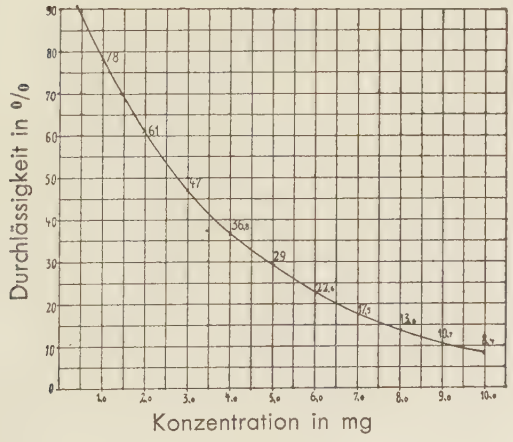
I. Die Bestimmung des Kreatinins.

Sie wird in folgender Weise ausgeführt: 20 ccm einer wässerigen Kreatininlösung von bekannter Konzentration werden in einem Meßkolben von 500 ccm mit 10 ccm einer 10%igen Natronlauge und 20 ccm einer gesättigten Pikrinsäurelösung (1.2%) versetzt und gemischt. Nach Ablauf von genau 5 Minuten wird die gefärbte Lösung mit Wasser von 18° bis zur Marke aufgefüllt und darauf die Messung in geeigneten Küvetten im Stufenphotometer vorgenommen.

Kurve Nr. 7.

Eichkurve der direkten Ablesewerte
für den Kreatiningehalt in 1 g des Untersuchungsmaterials

Filter S 50
Kammer 5 mm



Für die Aufstellung der Farbkurve wurde nach dieser Vorschrift der Farbton von 20 ccm einer 25 mg %igen Kreatininlösung mit den 8 Spektralfiltern gemessen und die Werte in Kurvenform aufgetragen. Nach dem Tiefpunkt der Kurve wäre das Filter S 43 am geeignetsten. Da jedoch, wie später festgestellt wurde, bei der praktischen Auswertung der Methode, eine Ablesung wegen zu geringer Lichtdurchlässigkeit bei den gegebenen Konzentrationen nicht möglich ist, wurde für alle Messungen das Filter S 50 gewählt.

Weiterhin sind nach Folin die Farbstärken von Lösungen mit 1 bis 10 mg Kreatiningehalt mit dem Filter S 50 bestimmt worden. Ihre direkten Ablesewerte der Lichtintensitäten ergeben dabei die Eichkurve (Nr. 7) während ihre Extinktionskoeffizienten eine gerade Linie bilden (Kurve Nr. 8). Demnach verläuft auch diese Reaktion nach dem Beerschen Gesetz und eine Unproportionalität zwischen Farbstärke und Kreatiningehalt, wie sie Baur und Trümpler bei Konzentrationen unter 5 mg festgestellt haben, konnte nicht nachgewiesen werden. (Tabelle XVIII).

Kurve Nr. 8

Eichkurve der Extinktionskoeffizienten für den Kreatiningehalt in 1 g des Untersuchungsmaterials

Filter S 50
Kammer 5 mm

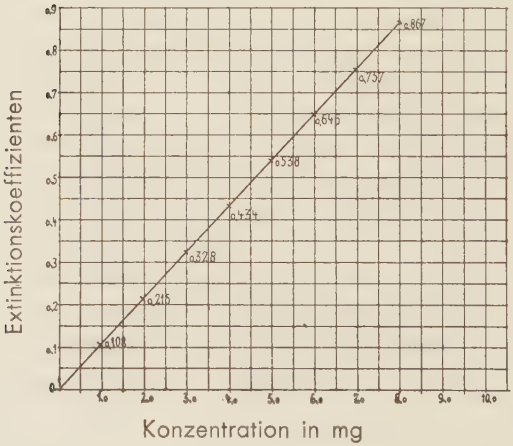


Tabelle XVIII.

Konzentration des Kreatinins mg	Schichtdicke der Kammer mm	Durchlässigkeit bei Filter S 50 in %	Extinktionskoeffizient bei Kammer 5 mm k
1,0	5	78	0,108
2,0	5	61	0,215
3,0	5	47	0,328
4,3	5	36,8	0,434
5,0	5	29	0,538
6,0	5	22,6	0,646
7,0	5	17,5	0,757
8,0	5	13,6	0,867
9,0	5	10,7	0,971
10,0	5	8,4	1,076

Bei diesen Versuchen wurde ein Kreatininpräparat von Merck verwendet, das entsprechend den Angaben früherer Autoren nach dem Auflösen in Wasser mit 10 ccm n-Salzsäure im Verlaufe von 2 Stunden auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft wurde, um evtl. vorhandenes Kreatin durch Inversion in Kreatinin überzuführen, da Kreatin, nach der Folinschen Methode behandelt, keine rote Färbung ergibt, sondern nur die Gelbfärbung der Lösung verstärkt.

II. Stufenphotometrische Messung des Kreatinins in Fleischbrühwürfeln des Handels.

Die oben angeführte Methode erweist sich innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches als hinreichend genau. Es war daher anzunehmen, daß sich auch in Fleischbrühwürfeln und ähnlichen Produkten der Kreatiningehalt stufenphotometrisch messen läßt. Nach Sudendorf und Lahrmann[28]) ist es aber notwendig, fremde in diesen Präparaten enthaltene Stoffe, die auch die Jaffésche Reaktion geben, durch Oxydation mit Permanganat zu zerstören. Es konnte durch eigene Versuche festgestellt werden, daß diese vorgeschlagene Zerstörung immer auszuführen ist, da diese Stoffe einen höheren Kreatiningehalt vortäuschen können. Die diesbezüglichen Untersuchungen er-

[28]) Z. U. L. 29, 1.

streckten sich auf eine Reihe verschiedener Substanzen, die als Zusätze zu Bouillonwürfeln Verwendung finden. Wie aus Tabelle XIV ersichtlich ist, ergibt reiner Tomatensaft mit alkalischer Pikrinsäurelösung Reaktionen, wie sie etwa einem Gehalt von 4—5 mg% Kreatinin entsprechen. Um dieses Maß wird auch in Lösungen des Kreatinins bei Zusatz von Tomatensaft der ermittelte Kreatiningehalt erhöht. Bei Zuckercouleur tritt sogar eine Farbintensität entsprechend 7 mg% ein. Nach der Oxydation der mit Tomatensaft, Hefeextrakt und Zuckercouleur versetzten Kreatininlösung ist aber nur der wirklich vorhandene Kreatiningehalt wiedergefunden worden. Es ist daher unbedingt notwendig, vor der Ausführung der Folinschen Probe die Oxydation mit Kaliumpermanganat vorzunehmen.

Tabelle XIX.

Art und Stärke der Lösung	Angewandte Menge ccm	Vor Behandlung m. Kaliumpermanganat mg Kreatinin	Nach Behandlung m. Kaliumpermanganat mg Kreatinin
Tomatensaft I (aus 6 Tomaten = 100 ccm)	10	4,9	keine Reaktion
Tomatensaft II (aus Püree)	10	3,7	keine Reaktion
Tomatensaft I und 100 mg % Kreatininlösung	10 5	9,8	5,0
Tomatensaft II 100 mg % Kreatininlösung	10 5	8,6	4,9
Hefeexrakt 10%ig	10	1,2	keine Reaktion
Zuckercouleur	1	6,9	keine Reaktion
Tomatensaft I Hefeextrakt 10%ig Zuckercouleur 10%ig Kreatininlösung 100 mg %ig	10 5 10 3	9,0	2,9

Inwieweit bei der Reaktion ein Ueberschuß an Permanganat für die Kreatininbestimmung schädlich ist, darüber geben die in Tabelle XX angegebenen Versuche Aufschluß. Es zeigt

sich, daß bei einem größeren Ueberschuß von Permanganat auch das Kreatinin angegriffen wird. Es ist deshalb notwendig, worauf schon Pfizenmaier und Galanos[29]) hinweisen, die Kaliumpermanganatlösung tropfenweise zuzugeben und nur solange, bis ein geringer Ueberschuß vorhanden ist, der etwa im Farbton dem Malagawein entspricht. Auf diese Weise läßt sich ohne weiteres vermeiden, daß durch einen zu großen Ueberschuß an Permanganat das vorhandene Kreatinin angegriffen wird. Die ausgeführten Versuche legen immerhin zur Genüge dar, daß die Permanganatbehandlung sich gut dafür eignet, die zu untersuchende Fleischbrühwürfelmasse für die quantitative Bestimmung ihres Fleischextraktgehaltes in zweckentsprechender Weise vorzubereiten.

Tabelle XX.

Angewandte Menge Kreatinin mg	Zusatz von 1%iger Kaliumpermanganatlösung ccm	Gefundene Menge Kreatinin mg
5,0	1	5,0
5,0	3	4,9
5,0	5	4,85
5,0	10	4,5
5,0	15	4,1
10,0	3	10,0
10,0	10	9,5
10,0	15	9,0

Das Verfahren von Sudendorf und Lahrmann ist bei den späteren Untersuchungen mit dem Stufenphotometer stets angewandt worden und soll deshalb hier genau in der Form angegeben werden, wie es diese Autoren für Brühwürfel ausgearbeitet haben :

Je nach dem vorhandenen Fleischextraktgehalte wird eine 10%ige oder stärkere Lösung der Bouillonwürfel hergestellt, die zur Beseitigung des vorhandenen Fettgehaltes filtriert werden muß. Von der erhaltenen klaren Lösung werden 10 ccm mit 10 ccm n Salzsäure in einer kleinen Porzellanschale von etwa 75 ccm Inhalt in einer Zeit von etwa 2 Stunden auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Der durchweg schwarzbraune Rückstand wird mit Wasser aufgenommen und mit n/2 Natronlauge unter Verwendung von Lackmuspapier (Tüpfelverfahren) genau neutralisiert. Die neutrale Flüssigkeit wird dann quanti-

[29]) Z. U. L. 49, 29.

tativ in ein weithalsiges Erlenmeyerkölbchen übergeführt und mit destilliertem Wasser auf etwa 75 ccm verdünnt. Zu dieser Lösung setzt man solange tropfenweise 1%ige Kaliumpermanganatlösung zu, bis ein geringer Ueberschuß vorhanden ist, der an einer braunroten Färbung, etwa vom Farbton des Malagaweines, erkannt wird. Bei ungesalzenem Untersuchungsmaterial ist Kochsalz zuzusetzen, und man verwendet daher zweckmäßig allgemein eine Permanganatlösung, die 2,5% NaCl enthält. Ist der Ueberschuß von Permanganat zu erkennen, der sich einige Minuten lang hält, so setzt man weiter tropfenweise eine 3%ige Wasserstoffsuperoxydlösung zu, die auf 100 ccm 1 ccm Eisessig enthält, bis zwischen den zusammengeballten Mangansuperoxydflocken eine stroh- bis höchstens weingelbe, klare Flüssigkeit sichtbar wird. Sodann erhitzt man das Reaktionsgemisch etwa 5—10 Minuten auf dem Wasserbade, bis sich das Mangansuperoxyd entweder völlig auf dem Boden oder auch teilweise an der Oberfläche abgeschieden hat. Der Niederschlag wird dann durch Filtration der noch heißen Flüssigkeit durch ein Asbestfilter unter Anwendung der Saugpumpe entfernt und solange mit heißem Wasser nachgewaschen, bis die ablaufende Flüssigkeit keine Chlorreaktion mehr zeigt. Das meist farblose Filtrat wird auf dem Wasserbade eingeengt, dann abgekühlt und mit geringen Mengen Wasser quantitativ in einen Meßkolben von 500 ccm gespült, darin auf 20 ccm aufgefüllt und mit 10 ccm einer 10%igen Natronlauge und 20 ccm einer gesättigten Pikrinsäurelösung versetzt. Nach Ablauf von genau 5 Minuten wird die Lösung mit Wasser von 18° aufgefüllt und nach evtl. Filtration wird eine kleine Menge in die geeignete Küvette gebracht. Die Messung der Durchlässigkeit wird dann im Stufenphotometer gegen eine Lösung vorgenommen, die 20 ccm der Pikrinsäurelösung in 500 ccm Wasser enthält. Nach den erhaltenen Werten kann man aus einer der beiden Kurven Nr. 11 u. 12 oder durch Rechnung nach Tabelle XVIII sofort den Kreatiningehalt bestimmen. Die entstehende Farbe hält sich bei der niederen Temperatur ungefähr 10 bis 15 Minuten unverändert, wonach sie langsam an Intensität abnimmt.

Nach dieser Methode wurde darauf in einer Reihe von Fleischextraktpräparaten des Handels der Kreatiningehalt untersucht. (Tabelle XXI). Zur Nachprüfung dieser Werte wurde die Farbmessung auch im Kolorimeter nach Dubosque ausgeführt, wobei als Vergleich eine Kreatininlösung von bekanntem Gehalt diente. Die Differenz der erhaltenen Werte ist wohl durch die größere Genauigkeit der stufenphotometrischen Messung bedingt.

Tabelle XXI.

Art des Untersuchungsmaterials	Gehalt an Gesamtkreatinin in 100 g	
	Stupho mg	Dubosque mg
Fleischbrühwürfel	568	575
Fleischbrühwürfel	452	435
Fleischbrühwürfel	508	490
Hühnerfleischbrühwürfel	532	525
Hühnerfleischbrühwürfel	445	462
Hühnerfleischbrühwürfel	530	517
Fleischbrühe konz.	100	—
Rindfleischbrühe	602	611
Suppenpaste	540	526
Liebigs Fleischextrakt	6510	6480
Bouillonextrakt	352	—

Frühere Autoren haben zu dem Farbenvergleich im Dubosque eine n/2 Kaliumbichromatlösung herangezogen. Bei der stufenphotometrischen Messung dieser Lösung ergab sich aber, daß deren Farbkurve einen etwas anderen Verlauf zeigt wie die der Kreatininlösung. Sie steigt schneller an und somit ergibt sich stufenphotometrisch mit dem gewählten Filter S 50 keine Vergleichsmöglichkeiten, denn in dem Spektralbereich dieses Filters zeigt die Bichromatlösung eine größere Absorption als die gefärbte Lösung von 10 mg Kreatinin bei gleicher Schichtdicke.

Zusammenfassung.

1. Die Jaffésche Reaktion wurde stufenphotometrisch ausgewertet und mit gutem Erfolge zur Untersuchung von Fleischbrühwürfeln und konzentrierten Suppen benutzt.
2. Die Beseitigung der störenden Stoffe nach Sudendorf und Lahrmann ist immer vorzunehmen. Dabei ist aber ein zu großer Ueberschuß von Kaliumpermanganat zu vermeiden, der das Kreatinin selbst angreifen kann. Hält man sich genau an die Vorschrift, so werden immer richtige Werte für Kreatinin gefunden.
3. Eine n/2 Kaliumbichromatlösung als Vergleich auch im Stufenphotometer zu verwenden, ist durch den anderen Verlauf ihrer Farbkurve nicht möglich. Bei den vergleichenden Untersuchungen im Dubosque wurden daher reine Kreatininlösungen von bekanntem Gehalt verwendet.

E. Kolorimetrische Bestimmung der höheren Alkohole, der Aldehyde und des Furfurols mit dem Stufenphotometer.

Die gesetzliche Grundlage für die Analyse und Begutachtung des Weinbrandes bildet die Bestimmung, daß bei seiner Herstellung nur solche Weindestillate verwendet werden dürfen, denen die den Weinbrand kennzeichnenden Bestandteile des Weines nicht entzogen sind. Die Untersuchung von Weinbrand sowie von Brennweinen erstreckt sich daher neben der Alkoholbestimmung in der Hauptsache auf die Bestimmung des Gehaltes an Säure, Fuselöl, Aldehyden, Estern und Furfurol. Für die chemische Analyse der letzteren Stoffe sind die verschiedensten Verfahren bekannt.

Von Girard und Cuniasse[30]) wurde der sogenannte „Verunreinigungskoeffizient" aufgestellt, der aus den Ergebnissen der Bestimmung der obigen Bestandteile des Weinbrandes summarisch eine Grenzzahl darstellt, die wohl bei französischen Erzeugnissen, welche im großen und ganzen eine annähernd konstante Zusammensetzung haben, die Grundlage einer Begutachtung bilden kann. Aber auch hier wird diese Zahl zu einer schematischen Beurteilung führen, da z. B. der Fall eintreten kann, daß Aldehyd und flüchtige Säure sehr hoch, der Gehalt an Estern und höheren Alkoholen dagegen sehr niedrig ist. Dann würde unter Zugrundelegung des Verunreinigungskoeffizienten das Produkt als Normal gelten, während es tatsächlich zu beanstanden wäre. Außerdem liegen bei den deutschen Weinbränden die Verhältnisse bezüglich ihres Gehaltes an höheren Alkoholen, Estern, Aldehyden und Furfurol anders als bei den französischen Weindestillaten. Es ist daher zweckmäßig, der Beurteilung von Weinbränden nicht die Summe der genannten Stoffe zugrunde zu legen, sondern den ermittelten Gehalt der einzelnen Bestandteile heranzuziehen.

Für die einzelnen Verbindungen sind in der Literatur folgende Methoden vorgeschlagen :

Die höheren Alkohole werden bestimmt durch:

1. das Verfahren von Röse,[31]) das auf der Ausschüttelung der höheren Alkohole mit Chloroform beruht, dessen Steighöhe

[30]) Manual. Prat. de l'analyse des alcools et des spiritueux.
[31]) Röttger, Bd. II S. 1637.

dann in besonders konstruierten Schüttelbüretten gemessen wird.

2. das Verfahren nach Komarowsky,[32]) das auf der Eigenschaft des Salicylaldehyds beruht, in fuselölhaltigem, reinem Alkohol eine Rotfärbung von verschiedener Stärke hervorzurufen. Es wurde später von Th. v. Fellenberg[33]) dahin abgeändert, daß es auch zur Bestimmung des Fuselöls in Weinbrand angewandt werden kann.

Die quantitative Bestimmung der Aldehyde erfolgt meist mit den nachstehenden Verfahren :

1. nach der amtlichen Methode durch Versetzen mit Hydroxylaminlösung und Titration der freiwerdenden Säure mit n/10 Lauge.
2. kolorimetrisch mit dem Schiffschen Reagenz.
3. kolorimetrisch mit Metaphenylendiamin.
4. titrimetrisch mit Jodlösung nach Rieter.[34])

Zum quantitativen Nachweis des Furfurols dient :

1. die Farbreaktion mit Anilin und Salzsäure;
2. die Violettfärbung mit β-Naphtol und konzentrierter Schwefelsäure.

In einer ausführlichen Arbeit gibt Graff[35]) genaue Vorschriften bekannt, indem er darauf hinweist, daß nur dann vergleichbare Untersuchungsresultate zu erwarten sind, wenn die einzelnen Bestandteile nach bestimmten, zu Einheitsmethoden zu ernennenden Verfahren ermittelt werden.

Er schlägt folgende Reaktionen vor :

1. Bestimmung der höheren Alkohole nach dem durch v. Fellenberg abgeänderten Verfahren nach Komarowsky.
2. Bestimmung der Aldehyde mit dem Schiffschen Reagenz.
3. Nachweis des Furfurols durch die Rotfärbung mit Anilin und Salzsäure.

Soweit hier bekannt ist, werden diese Methoden auch für die Gutachten bei Weinbrand an den Untersuchungsämtern herangezogen.

Wenn auch die chemische Analyse in der obengenannten Richtung allein zur Beurteilung von Weinbrand und Weinbrandverschnitt nicht ausreicht, sondern noch die Sinnesprüfung, die

---

[32]) Chemikerzeitung 1903, 27, 807 und 1086.
[33]) Mitteilungen lebensmittelchemischer Untersuchungen, 1910, 1, 311.
[34]) Zeitschr. anal. Chem. 1897, 36, 403.
[35]) Z. U. L. 54, 102.

fraktionierte Destillation im Birektifikator und die Ergiebigkeitsprobe vorgenommen werden muß, so ist sie doch eine große Stütze in der schwierigen Beurteilung dieser Produkte.

Bei den kolorimetrischen Methoden ist es aber zeitraubend, jedesmal die Vergleichslösung, die für die Farbmessung nötig ist, herzustellen. Es hat sich auch ferner ergeben, daß mit diesen Vergleichslösungen in den einfachen Kolorimetern keine exakten Bestimmungen durchgeführt werden können. Daher wurde versucht, diese Farbreaktionen mit dem Stufenphotometer zu messen und sie für die Praxis auszuarbeiten.

1. Bestimmung der höheren Alkohole.

Die Hauptbestandteile des Fuselöls, das an dem Aroma des Weinbrandes beteiligt ist, sind die höheren Homologen des Aethylalkohols, die sich von diesem durch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden. Von besonderem Interesse für die weiteren Versuche war ihre Eigenschaft mit Salizylaldehyd und Schwefelsäure eine rötliche Färbung zu geben, deren Intensität jedoch bei den einzelnen höheren Alkoholen verschieden ist.

Von Fellenberg hat früher diese Farbstärken verglichen, wobei er folgende Zahlen erhielt, bezogen auf Amylalkohol = 100.

1. Normalpropylalkohol	9,3	Vol. %
2. Isopropylalkohol	6,2	„ „
3. Normalbutylalkohol	6,8	„ „
4. Isobutylalkohol	296,5	„ „
5. Tertiärbutylalkohol	85,8	„ „
6. Amylalkohol	100,0	„ „
7. Isoamylalkohol	95,1	„ „
8. Tertiäramylalkohol	102,2	„ „
9. Cognacfuselöl	148,2	„ „

Die dabei von v. Fellenberg verwendeten Alkohole waren die reinen Produkte der Firma Kahlbaum; nur der Isopropylalkohol stellte ein gewöhnliches Handelsprodukt dar. Das unter Nr. 9 stehende Cognacfuselöl bestand aus einem „Cognactyp" des eidgenössischen Alkoholamtes, der nach der Röseschen Methode auf 2 Vol.-‰ höhere Alkohole, bezogen auf absoluten Alkohol, eingestellt war. Die Zahlen der obigen Tabelle wurden nun durch Versuche mit den verschiedenen höheren Alkoholen im Stufenphotometer nachgeprüft, wobei zuerst die Methode von Graff umgewandelt wurde.

Graff benutzte zur Auslösung der Reaktion den Salicylaldehyd, der aber bei den damit angestellten Versuchen verschiedene Nachteile aufwies. Sie bestehen darin, daß eine Lösung, die Salicylaldehyd in alkoholischer Verdünnung enthält, infolge der großen Flüchtigkeit des letzteren nicht lange eine konstante Stärke aufweisen kann, und daß beim Mischen mit Schwefelsäure eine Gelbfärbung hervorgerufen wird, die den Farbton der Fuselölreaktion beeinflußt. Ferner entstanden auch bei der Verwendung des Aldehyds des öfteren graue Trübungen der Farbflüssigkeit, die sich nicht beseitigen ließen.

Auf Grund dieser Vorversuche wurde daher auf Anregung einer Arbeit von v. Fellenberg „Ueber Farbreaktionen aromatischer Aldehyde" der p-Oxybenzaldehyd bei den späteren Arbeiten benutzt. Nach Angaben des Verfassers bleibt dieser Aldehyd zum Unterschied von Salicylaldehyd mit Schwefelsäure allein vollkommen farblos, und gibt mit den höheren Alkoholen sehr klare Färbungen. Er reagiert außerdem mit den Aldehyden der Fettreihe nicht, wodurch bei der eigentlichen Untersuchung von Weinbränden eine Zerstörung der Acetale unnötig geworden ist, und die Silberoxydbehandlung des Cognacdestillates dann weniger dem Zweck dient, die Aldehyde quantitativ zu entfernen, als die Terpene und sonstige ungesättigte Verbindungen zu zerstören. Ferner wurde nach einer weiteren Anregung von v. Fellenberg das Graffsche Verfahren zu einer Mikromethode umgestaltet, bei der die Reaktion in mit Glasstöpseln versehenen Reagenzgläsern vorgenommen und die Auslösung der Farbe im siedenden Wasserbad nach vorheriger Kühlung des Destillatschwefelsäuregemisches erreicht wird.

Zunächst sind die erforderlichen Lösungen hergestellt worden.

1. Eine einprozentige Lösung von p-Oxybenzaldehyd in 30%-igem Alkohol.
2. Eine Schwefelsäure, die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt wurde.
3. Mehrere Lösungen, welche die einzelnen höheren Alkohole in verschiedenen Konzentrationen enthielten.

Ausführung der Bestimmung.

Mittels einer sehr genauen in 100tel ccm eingeteilten Pipette bringt man 1 ccm der Lösung eines höheren Alkohols in ein mit Glasstopfen versehenes Reagenzglas, gibt 4 ccm konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig zu und kühlt nach dem Mischen durch 10 Minuten langes Einstellen in Wasser von 20°. Alsdann

setzt man 0,5 ccm des Aldehydreagenzes und 10 ccm der verdünnten Schwefelsäure zu, verschließt das Glas und mischt langsam gut durch. Nach Aufsetzen eines kurzen Steigrohres wird darauf das Reagenzglas genau 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Herausnehmen läßt man dann die Mischung ohne künstliche Beschleunigung bei Zimmertemperatur abkühlen und füllt sie in die geeignete Küvette.

Über den chemischen Verlauf dieser Reaktion ist hervorzuheben, daß nicht die höheren Alkohole selbst an der Reaktion beteiligt sind, sondern es findet beim Zusammenbringen der Schwefelsäure mit dem fuselölhaltigen Alkohol, begünstigt durch eine dabei eintretende starke Erwärmung, eine Spaltung der höheren Alkohole in die entsprechende Olefine statt und erst diese rufen dann durch ihre Verbindung mit dem p-Oxybenzaldehyd die Färbung der Flüssigkeit hervor.

An einer Reihe von Lösungen der einzelnen höheren Alkohole, die wegen deren verschiedenen Farbstärken in wechselnden Konzentrationen hergestellt wurden, sind die Farbkurven der einzelnen höheren Alkohole aufgestellt worden. Zum Ausgleich der Lichtverluste wurde dabei in den anderen Strahlengang des Stufenpohotometers eine Küvette eingeschaltet, die eine aus den gleichen Reaktionsflüssigkeiten zusammengesetzte Mischung enthielt, bei der nur statt des Aldehydreagenzes dieselbe Menge an 30%igem Alkohol zugesetzt wurde. Die tiefsten Punkte aller Kurven lagen bei dem Filter S 57.

Die weiteren Versuche wurden in Lösungen abgestufter Konzentrationen der einzelnen Alkohole vorgenommen, wobei die Resultate eine gute Uebereinstimmung mit den Forderungen des Beerschen Gesetzes ergaben. Die Ablesungen mußten dabei genau 20 Minuten nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbade erfolgen, da festgestellt wurde, daß die Farbintensität bei längerem Stehen zunimmt. Da aber diese Zunahme bei den niederen Konzentrationen größer ist als bei den höheren, so hat dadurch das Beersche Gesetz keine Gültigkeit mehr.

Bei gleichen Konzentrationen ergaben die höheren Alkohole verschieden starke Färbung, deren Intensitäten wiederum verglichen und auf Amylalkohol = 100 bezogen wurden.

1.	Normalpropylalkohol	55,3 Vol. %
2.	Isopropylalkohol	21,3 „ „
3.	Normalbutylalkohol	10,2 „ „
4.	Isobutylalkohol	466,7 „ „
5.	Tertiärbutylalkohol	125,2 „ „

6.	Amylalkohol	100,0	„ „
7.	Isoamylalkohol	95,0	„ „
8.	Tertiäramylalkohol	155,0	„ „
9.	Typlösung 2 ‰	181,0	„ „
10.	Fuselöl (techn. Amylalkohol)	178,0	„ „

Ein Vergleich dieser Zahlen mit denen, die von Fellenberg früher aufgestellt hatte, ergibt nicht direkt eine Uebereinstimmung. Nur in Beziehung der mehr oder minder starken Färbung gegenüber dem Amylalkohol lassen sich verhältnismäßig die

Tabelle XXII.

Zeitliche Veränderung der Farbintensitäten einer Typlösung, die durch Einwirkung von p-Oxybenzaldehyd und konzentrierter Schwefelsäure gemäß der angegebenen Vorschrift erhalten wurde. Gemessen gegen die gleichfalls angeführte Kompensationsflüssigkeit unter Vorschaltung des Filters S. 57.

Zeit nach d. Heraus-nehmen aus dem Wasserbad in Min.	Schicht-dicke der Kammer mm	Konzentration der Typlösung bezogen auf absoluten Alkohol.					
		2‰ in 30 Vol. % Alk.			1‰ in 30 Vol. % Alk.		
		Durchlässigkeit in %					
		1.	2.	3.	1.	2.	3.
5	10	25	27	26	52	55	53
10	10	17	16	15	40	41	40
15	10	15	13	13	38	38	37
20	10	11,5	12	12,5	35	36	34
25	10	11	11,5	11	34	33	33
30	10	10,5	11	10	32	30	31
35	10	10	9,5	9,7	31	29	29
40	5	30	29	30	53	52	52
50	5	29	27	28	51	52	51
60	5	27	27	26	50	49	50
80	5	25	26	25	48	47	48

Resultate vergleichen. Die Abweichungen dieser Messungen sind dadurch zu erklären, daß v. Fellenberg die kolorimetrische Bestimmung in einem gewöhnlichen Kolorimeter gegenüber einer gefärbten Vergleichslösung ausgeführt hat, während im Stufenphotometer diese Messungen ohne Vergleichslösung bei einem ganz bestimmten Filter vorgenommen wurden. Bemerkenswert ist bei den Zahlen 9 und 10, daß sie eine annähernde Gleichheit der beiden Werte ergeben, so daß also die von v. Fellenberg an-

gegebene Typlösung fast dieselbe Farbreaktion wie das Fuselöl des Handels zeigt.

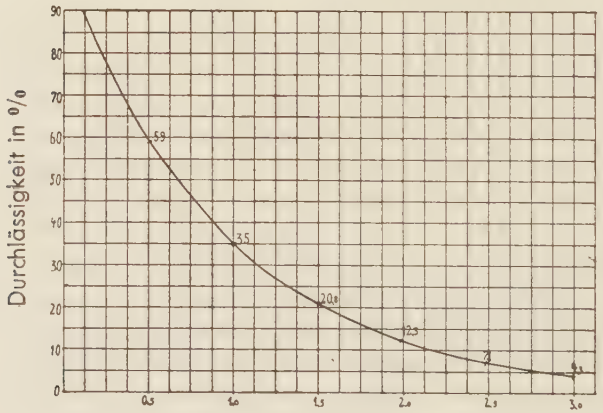
Herstellung und Messung der Typlösung.

Da die Bestimmung des Fuselölgehaltes in Weinbrand auf einer konventionellen Methode beruht, wird die Menge der in einem vorliegenden Weinbrand enthaltenen höheren Alkohole kolorimetrisch mit Hilfe einer Typlösung festgestellt. Diese Typlösung ist aber umständlich herzustellen und wurde deshalb eine Eichkurve ihrer jeweiligen Farbstärke bei verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe des Stufenphotometers angelegt. Zu diesen Messungen ist eine Typlösung nach den Angaben von Graff hergestellt worden aus einer Mischung von 0,8 ccm Amylalkohol und 0,2 ccm Isopropylalkohol in 100 ccm 30%igem Alkohol, die durch weitere Verdünnung mit letzterem auf genau 2‰ an höheren Alkoholen, bezogen auf absoluten Alkohol, eingestellt wurde. Sie hält im Farbton ungefähr die Mitte zwischen der rosaroten Farbe der Amylalkoholreaktion und der blauroten der Isopropylalkoholreaktion. Sie hat sich bei den späteren Untersuchungen bewährt, da ihr Farbton auch schon äußerlich sehr gut mit den Färbungen der Fuselöle von Weinbränden des Handels übereinstimmte.

Kurve Nr. 9

Eichkurve der direkten Ablesewerte für den Gehalt an höheren Alkoholen in 1 lt absolutem Alkohol.

Filter S 57
Kammer 10 mm



Konzentration in Vol. ‰
bezogen auf absoluten Alkohol.

Aus der Farbkurve der Typlösung ging hervor, daß auch ihr Tiefpunkt bei Filter S 57 liegt. Dieses Filter wurde daher bei den weiteren Versuchen stets in den Strahlengang eingeschaltet. Die gradlinige Proportionalität zwischen der Konzentration und den negativen Logarithmen der direkten Ablesewerte ergab dabei die Gültigkeit des Beerschen Gesetzes. Es kann also direkt aus den erhaltenen Meßergebnissen der untersuchten Weinbrände der Gehalt an Fuselöl aus den Eichkurven der Typlösung oder durch Rechnung aus den Extinktionskoeffizienten, die in Tabelle XXIII angeführt sind, festgestellt werden. (Kurven 9 und 10).

Kurve Nr. 10

Eichkurve der Extinktionskoeffizienten für den Gehalt an höheren Alkoholen in 1 lt absoluten Alkohol.

Filter S 57
Kammer 10 mm

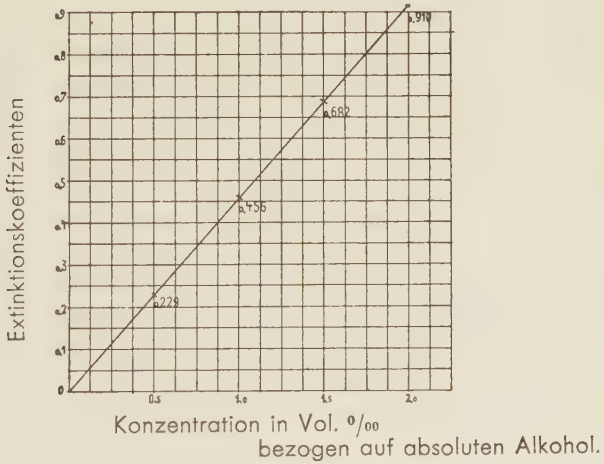


Tabelle XXIII.

Konzentration der Typlösung a. abs. Alkohol bezogen Vol. 0/00	Schichtdicke der Kammer mm	Durchlässig- bei Filter S 57 in %	Extinktions- koeffizient auf Kammer 10 mm bezogen k
0,5	10	59	0,229
1,0	10	35	0,456
1,5	10	20,8	0,682
2,0	10	12,3	0,910
2,5	10	7,1	1,149
3,0	5	20,8	1,364

2. Bestimmung der höheren Alkohole im Weinbrand des Handels.

Zunächst wird nach Graff in dem zu untersuchenden Branntwein der Alkohol mit Hilfe des Pyknometers festgestellt, wobei man 50 ccm des Branntweins mit 25 ccm Wasser verdünnt und daraus durch Destillation den Alkohol übertreibt. Nach dem spezifischen Gewichte entnimmt man aus der Tabelle den Alkohol in Vol.-%. Zur Herstellung des nunmehr benötigten 30%igen Destillates verdünnt man die diesem Gehalte entsprechende Menge Weinbrand mit Wasser auf gut 100 ccm und erhält hieraus nach der Destillation 100 ccm eines Destillates mit 30 Vol.-% Alkohol. Nach dem Auffüllen und Mischen des Destillates werden dann 50 ccm in einem 250 ccm Destillationskolben mit 2 ccm einer 30%igen Kalilauge und 3 ccm einer 5%igen Silbernitratlösung versetzt. Nach Zusatz einiger Siedesteinchen wird das Kölbchen durch einen Aufsatz mit einem Kühler verbunden, dem ein 50 ccm Meßkölbchen als Vorlage dient. Der aufsteigende Schenkel des Destillationsaufsatzes wird dabei nach Angaben v. Fellenbergs mit einem nassen Tuch umwunden, um während der ersten 5 Minuten als Rückflußkühler der in schwachem Sieden gehaltenen Flüssigkeit zu dienen. Nach Ablauf dieser Zeit sind, wie die Untersuchungen von v. Fellenberg ergaben, durch das Silberoxyd und die Lauge die störenden Aldehyde und Terpene beseitigt. Darauf destilliert man nach Entfernung des Tuches den größten Teil der Flüssigkeit über, füllt das Kölbchen mit Wasser bis zur Marke auf und mischt gut durch. Von diesem Destillat wird dann 1 ccm nach der oben angegebenen Vorschrift weiterbehandelt. Durch Messung der erreichten Farbintensität erhält man den Ablesewert, aus dem nach den ausgewerteten Resultaten der Typlösung der gesuchte Gehalt an Fuselöl gefunden wird. Dabei bietet wiederum die Messung der Farbstärken mit dem Stufenphotemeter einen Vorteil dadurch, daß nicht wie bei den bisherigen Verfahren eine Wiederholung der Reaktion mit einer Typlösung von anderem Gehalt nötig ist, wenn die erhaltenen Farbstärken der Typ- und Destillationslösung nicht ungefähr gleich stark waren.

Die Tabelle XXIV bringt die Werte an höheren Alkoholen, die nach der neuen Methode in verschiedenen Weinbränden gefunden wurden. In den Nummern 1—6 sind Marken bekannter Firmen untersucht worden. Die Nummern 7—13 stellen Weinbrände und Weinbrandverschnitte dar, die dem hiesigen Untersuchungsamte zur Kontrolle eingeliefert wurden.

Tabelle XXIV.

Nr.	Bezeichnung	Spez. Gewicht bei 15°	Alkohol Vol. %	in 1 lt. Destillat v. 30%			auf 1 lt. absol. Alkohol bez.		
				Aldehyde mg	Furfurol mg	Höhere Alkohole cmm	Aldehyde mg	Furfurol mg	Höhere Alkohole cmm
1	Weinbrand	0,9524	39,8	78	1,9	644	257	6,3	2126
2	Weinbrand	0,9544	38,5	63	0,4	543	207	1,3	1790
3	Weinbrand	0,9555	37,7	40	1,6	615	132	5,3	2030
4	Weinbrand	0,9543	38,6	51	0,2	660	168	0,7	2175
5	Weinbrand	0,9502	41,2	55	2,3	722	181	7,6	2382
6	Weinbrand	0,9546	38,3	38	3,3	673	125	10,9	2220
7	Weinbrand	0,9551	38,0	27	1,3	594	89	4,3	1962
8	Weinbrand	0,9552	37,9	53	2,9	715	174	9,6	2326
9	Weinbrand	0,9549	38,1	110	0,7	524	363	2,3	1728
10	Weinbrand	0,9541	38,7	70	0,4	448	231	1,3	1478
11	Weinbrand-verschnitt	0,9565	37,1	23	0,1	157	76	0,3	517
12	Weinbrand-verschnitt	0,9559	37,5	20	0	193	66	0	637
13	Weinbrand	0,9579	36,1	29	0	0	96	0	0

II. Kolorimetrische Bestimmung der Aldehyde.

Die Bestimmung des Aldehydgehaltes eines Weinbrands wird nach Graff mit dem Schiffschen Reagenz vorgenommen, das für die folgenden Versuche von der Firma Merck bezogen wurde und der Vorschrift des Deutschen Arzneibuches VI entsprach.

Zur quantitativen Bestimmung der Aldehyde werden 10 ccm einer Acetaldehydlösung in 30%igem Alkohol in einen Glaszylinder von ungefähr 30 ccm Inhalt gebracht, der vorher mit 6%iger wässeriger, schwefliger Säure vorgespült wurde. Nach Zusatz von 2 ccm des Schiffschen Reagenzes wird sofort in die Küvetten gefüllt und im Stufenphotometer gegen 30%igen reinen Alkohol gemessen. Die Reaktion nimmt dabei innerhalb von 15 Minuten stetig zu und beginnt nach Ueberschreitung des Höhepunktes sofort wieder an Stärke zu verlieren. (s. Tabelle XXV).

Tabelle XXV.

Zeitliche Veränderung der Farbintensitäten einer durch Einwirkung von fuchsinschwefliger Säure erhaltenen Acetaldehydlösung, gemessen gegen 30%igen Alkohol bei einer Temperatur von 15°.

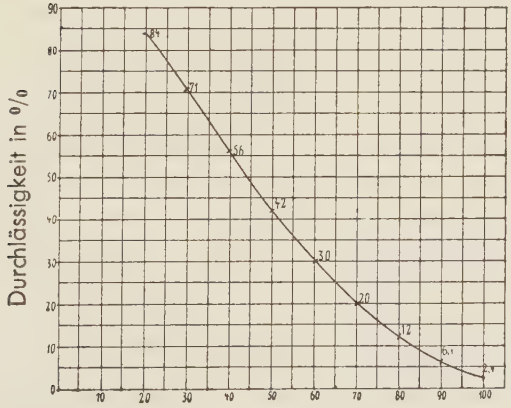
Zeit nach Zugabe des Schiffschen Reagenzes in Minuten	Schichtdicke der Kammer mm	Acetaldehydkonzentration in 10 ccm 30% Alkohols. 50 mg 0/00 Durchlässigkeit in % 1.	2.	3.	70 mg 0/00 Durchlässigkeit in % 1.	2.	3.
5	10	58	57	56	35	36	34
8	10	52	53	51	30	29	28
10	10	48	47	46	26	25	25
13	10	44	43	44	22	23	21
15	10	42	42,5	41,5	20	20	20
18	10	43	44	45	21	22	23
20	10	47	48	48	25	25	26
25	10	49	50	51	28	28	29
30	10	51	52	52	30	31	32

Für die Farbkurve wurden die Lichtintensitäten mit den 8 Filtern in einer Lösung, die 50 mg ‰ Acetaldehyd enthielt, abgelesen. Diese Lösung wurde durch Verdünnung mit reinstem

30%igem Alkohol aus einer 5%igen konzentrierten Lösung hergestellt, die in gut verschlossener, brauner Flasche längere Zeit haltbar war. Der Gehalt dieser Stammlösung wurde nach Graff öfters titrimetrisch kontrolliert, indem man in 50 ccm derselben nach Zugabe von 30 ccm einer annähernd Normal-Hydroxylaminchlorhydratlösung nach einer halben Stunde die freigewordene Salzsäure mit Methylorange und n-Natronlauge zurücktitrierte. Im blinden Versuch ist der Eigenverbrauch der Hydroxylaminlösung durch Titration mit n/10 Natronlauge geprüft worden, der dann nach Umrechnung von der beim Hauptversuch verbrauchten Menge abgezogen wurde. (1 ccm n/Natronlauge entspricht 0,044 g Aldehyd.)

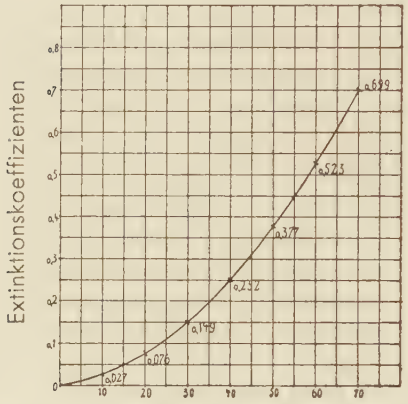
Mit Lösungen, die einen wechselnden Gehalt von 10 bis 100 mg ‰ Acetaldehyd hatten, wurden dann die Höhepunkte der Farbreaktion, die nach 15 Minuten eintraten, durch Vorschalten des als Tiefpunkt der Kurve gefundenen Filters S 57 abgelesen und die Werte kurvenmäßig in ein Koordinatensystem eingetragen. Dabei ergab die Verbindungslinie der Extinktionskoeffizienten keine Gerade. (Kurve Nr. 12). Das Beersche Gesetz trifft daher auf diese Farbmessungen nicht zu, und der jeweilige Gehalt an Aldehyden kann nur aus der aufgestellten Kurve Nr. 11 und nicht auf rechnerischem Wege gefunden werden.

Kurve Nr. 11.
Eichkurve der direkten Ablesewerte für den Aldehydgehalt in 1 lt. absoluten Alkohol.
Filter S 57
Kammer 10 mm



Konzentration in mg ‰, bezogen auf absoluten Alkohol.

Kurve Nr. 12.
Eichkurve der Extinktionskoeffizienten für den Aldehydgehalt in 1 lt. absoluten Alkohol.
Filter S 57
Kammer 10 mm



Konzentration in mg %, bezogen auf absoluten Alkohol.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde dann festgestellt, inwieweit die von Graff vorgeschlagene vorherige Ausspülung des Glases mit schwefliger Säure auf den Verlauf der Reaktion einwirkt, bzw. welche Aenderungen eintreten, wenn das Ausspülen unterlassen wird. Es wurde beobachtet, daß die Färbungen langsamer auftreten, aber dieselben Höhepunkte erreichen wie bei der Verwendung von schwefliger Säure. Bei diesen Versuchen konnte aber auch keine Gültigkeit des Beerschen Gesetzes nachgewiesen werden.

Die praktische Anwendung der Methode wurde darauf an denselben Branntweinen geprüft wie bei der Fuselölbestimmung. Die Werte sind in der Tabelle XXIV eingefügt und geben den Aldehydgehalt an, der in je 10 ccm des unbehandelten 30%-igen Destillates festgestellt und auf einen Liter absoluten Alkohol bezogen wurde.

III. Kolorimetrische Bestimmung des Furfurols.

Obwohl die Furfurolbestimmung bei der Beurteilung eines Weinbrandes nur eine untergeordnete Rolle hat, wurde der Vollständigkeit halber eine quantitative Methode mit Hilfe des Stufenphotometers ausgearbeitet. Dabei wurde das von Graff vorge-

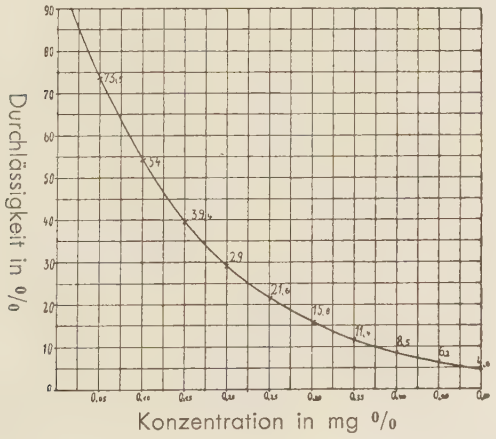
schlagene Verfahren gewählt, das darauf beruht, daß Furfurol mit Anilin und Salzsäure eine rötliche Färbung gibt. Bei den folgenden Versuchen ist jedoch nach einer Angabe der russischen Monopolverwaltung statt der konzentrierten Salzsäure Eisessig verwendet worden.

Zur Herstellung einer Stammlösung sind 2 g reines Furfurol (Merck) in 100 ccm Alkohol gelöst worden. Der genaue Gehalt wurde dann gewichtsanalytisch nach Tollens[36]) durch Fällung mit Phloroglucin aus der Menge des gewogenen Niederschlages, dem Phloroglucid gefunden. Durch geeignete Verdünnung mit 30%igem Alkohol wurden aus dieser Flüssigkeit weiterhin Lösungen mit einem Gehalt von 0,05 bis 0,4 mg % Furfurol hergestellt. Die Bestimmung wurde folgendermaßen ausgeführt:

10 ccm der Furfurollösung werden mit 0,5 ccm frisch destilliertem Anilin und 2 ccm Eisessig versetzt. Die entstehende Rotfärbung wird dann im Stufenphotometer nach 15 Minuten gegen 30%igen Alkohol gemessen. Das Anilinöl ist dabei in einem kleinen Fraktionskölbchen bereitgehalten worden, um jederzeit rasch einige ccm abdestillieren zu können.

In einer 0,3 mg %igen Lösung wurde dann mit den acht Filtern die Farbkurve festgelegt, nach der das Filter S 50 zur Messung am geeignetsten ist.

Kurve Nr. 13.
Eichkurve der direkten Ablesewerte
für den Furfurolgehalt in 100 ccm 30%igem Alkohol
Filter S 50
Kammer 10 mm



Weiterhin wurde in verdünnten Lösungen das Furfurol nach der obigen Reaktion bestimmt und die erhaltenen Werte in die Kurven 13 und 14 eingetragen. Die Nachprüfung des Beer-

Kurve Nr. 14
Eichkurve der Extinktionskoeffizienten
für den Furfurolgehalt in 100 ccm 30%igem Alkohol.
Filter S 50
Kammer 10 mm

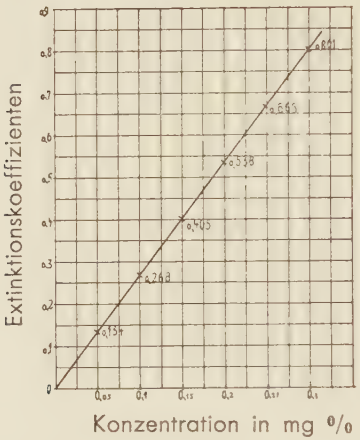


Tabelle XXVI.
Zeitliche Veränderung der Farbintensitäten einer durch Einwirkung von Anilin und Eisessig erhaltenen Furfurollösung. Gemessen gegen 30%igen Alkohol bei einer Temperatur von 20°.

Zeit nach Zugabe von Eisessig in Minuten	Schichtdicke der Kammer mm	Konzentration 0,2 mg% in 10 ccm 30%igen Alkohol Ablesungen bei Filter S 50			
		1.	2.	3.	4.
5	10	33	34	33	35
8	10	32	32	31	31
10	10	31	31	32	30
12	10	30	31	30	30
15	10	29	30	29	29
20	10	30	29	30	30
30	10	31	32	31	32
40	10	33	34	33	35
50	10	36	37	37	36

schen Gesetzes ergab das proportionale Anwachsen der Lichtstärken bei steigendem Gehalt an Furfurol, so daß die quantitative Bestimmung mit Hilfe der Kurven oder durch Rechnung (Tabelle XXVII) erfolgen kann.

Tabelle XXVII.

Konzentration d. Furfurols in 30 Vol. % Alkohol mg	Schichtdicke der Kammer mm	Durchlässigkeit bei Filter S 50 in %	Extinktionskoeffizient auf 10 mm bezogen k
0,05	20	54	0,134
0,10	10	54	0,268
0,15	10	39,4	0,405
0,20	10	29	0,538
0,25	10	21,6	0,666
0,30	10	15,8	0,801
0,35	10	11,4	0,943
0,40	5	29,2	1,070
0,45	5	25	1,204
0,50	5	21,5	1,336

In der Tabelle XXIV sind die Zahlen für den Furfurolgehalt von Branntweinen des Handels eingefügt.

Zusammenfassung.

1. Die kolorimetrischen Bestimmungen der höheren Alkohole, der Aldehyde und des Furfurols wurden mit Hilfe des Stufenphotometers ausgearbeitet.
2. Nur die Reaktionen der höheren Alkohole und des Furfurols verlaufen dabei nach dem Beerschen Gesetz. Die Aldehydreaktion dagegen entspricht bei höheren Konzentrationen nicht den Forderungen dieses Gesetzes.
3. An Weinbrand und Weinbrandverschnitt sind die kolorimetrischen Bestimmungen ausgeführt worden, wobei die Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials nach den abgeänderten Angaben von v. Fellenberg und Graff vorgenommen wurde.

Lebenslauf.

Am 5. Juni 1908 wurde ich in Worms als Sohn des Kaufmanns Hermann Keller geboren. Nachdem ich die Vorschulklassen durchlaufen hatte, trat ich Ostern 1917 in die Sexta der Oberrealschule in Worms ein, die ich Ostern 1926 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Nach halbjähriger Tätigkeit bei der Filiale der Rheinischen Creditbank in Worms, trat ich im November als Praktikant in die Engel-Apotheke in Worms ein. Nach Ablegung des Vorexamens im Dezember 1928 arbeitete ich während des Assistenten-Jahres in Apotheken in Worms und Baden-Baden.

Seit dem Wintersemester 1929 besuchte ich die Universität in München, an der ich im Oktober 1931 die Staatsprüfung als Apotheker ablegte.

Darauf studierte ich ein Semester organische Chemie am Pharmazeutischen Institut in Frankfurt am Main. Im Sommer-Semester 1932 begann ich dann im nahrungsmittelchemischen Institut der Universität Frankfurt unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Tillmans die vorliegende Arbeit.

Hermann Keller.